

Aus
der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Die subklinische *Staphylococcus aureus*-Mastitis -
Sanierung eines hessischen Milcherzeugerbetriebes
und epidemiologische Untersuchungen
mittels Staphylokokken-Protein A (spa)-Typisierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Claudia Sauerwald
aus Hermeskeil

Leipzig, 2013

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Axel Sobiraj

Gutachter: Prof. Dr. Axel Sobiraj
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Martina Hoedemaker
Klinik für Rinder
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 08.10.2013

Für meine Eltern

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Mastitis der Rinder	2
2.1.1	Ursachen	3
2.1.2	Verlaufsformen und klinisches Bild.....	4
2.1.3	Mastitis als Bestandsproblem.....	5
2.2	Mastitiserreger	6
2.2.1	Umweltmastitiserreger	7
2.2.2	Kontagiöse Mastitiserreger.....	7
2.2.3	Minor-pathogene Mastitiserreger	9
2.3	S. aureus als Mastitiserreger	9
2.3.1	Taxonomie und genetische Untersuchungen	11
2.3.2	Bedeutung und Folgen von S. aureus im Bestand	23
2.3.3	Prophylaktische Maßnahmen	26
2.3.4	Therapiemöglichkeiten der S. aureus-Mastitis	27
2.3.4.1	Chemotherapeutika zur Therapie von S.aureus-Mastitiden	28
2.3.4.2	Einsatz von Schutzimpfungen gegen S.aureus-Mastitiden.....	30
3	Tiere, Material und Methoden	37
3.1	Versuchsbetrieb	37
3.1.1	Aktueller Status der Eutergesundheit und Klinik im Bestand.....	38
3.1.2	Historie bisher erfolgter Bestandssanierung	38
3.2	Erarbeitung eines Sanierungskonzeptes im Versuchsbetrieb.....	39
3.2.1	Entfernung therapieresistenter Tiere	40
3.3	Entnahme der Viertelgemelksproben	40
3.4	Entnahme von Umweltproben.....	40
3.5	Zytobakteriologische Untersuchung der Viertelgemelksproben	41
3.5.1	Vergleich unterschiedlicher Ausstrichverfahren	43
3.6	Bakteriologische Untersuchung der Umweltproben	43
3.7	Konservierung der S. aureus-Isolate	44
3.8	Auswahl weiterer in Hessen isolierter boviner S. aureus-Stämme.....	44
3.9	Phänotypische Identifizierung von S. aureus	45
3.9.1	Wachstum auf Blutagar	45
3.9.2	Nachweis der Plasma-Koagulase	46
3.9.3	Untersuchung mittels VITEK2	46
3.10	Genotypische Identifizierung des S. aureus	47
3.10.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	47

3.10.1.1	DNA-Präparation	47
3.10.1.2	Durchführung der PCR	47
3.10.1.3	Agarosegelelektrophorese.....	48
3.10.1.4	Ethidiumbromidfärbung	48
3.10.1.5	Untersuchung auf das Theronuklease-Gen (nuc).....	48
3.10.1.6	Untersuchung auf das Koagulasegen (coa)	49
3.10.1.7	Untersuchung auf das Protein-A-Gen (IgG-bindende Region)	49
3.10.1.8	Untersuchung auf das Protein-A-Gen (Xr-Region)	50
3.10.1.9	Untersuchung auf das Protein-A-Gen (Xr-Region) für das spa-Typing	50
3.10.1.10	Untersuchung auf das mecA-Gen.....	50
3.10.2	Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese (Pfge).....	51
3.10.2.1	Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA.....	51
3.10.2.2	Pulsfeldgelelektrophorese.....	52
3.10.2.3	Ethidiumbromidfärbung	53
3.10.2.4	Auswertung der Pfg-Muster	53
3.11	Staphylokokken-Protein-A (spa)-Typisierung	53
3.11.1	Vorbereitung der Amplifikate	53
3.11.2	Auswertung der Sequenzen	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Viertelgemelksproben	55
4.1.1	Vergleich der verschiedenen Ausstrichverfahren.....	55
4.2	Umweltproben	57
4.3	Identifizierung des S. aureus	58
4.3.1	Phänotypische Identifizierung	58
4.3.1.1	Koagulasetests	58
4.3.1.2	Bestätigung durch VITEK2.....	58
4.3.2	Genotypische Identifizierung.....	59
4.3.2.1	PCR-Auswertung	59
4.3.2.2	Makrorestriktionsanalyse	61
4.3.2.3	spa-Typisierung aus dem Sanierungsbetrieb.....	66
4.3.2.4	spa-Typisierung aus weiteren in Hessen isolierten bovinen S. aureus- Stämmen.....	67
4.3.2.5	Zusammenfassung der genotypischen Untersuchungsergebnisse aus dem Sanierungsbetrieb.....	70
4.4	Anwendung des Sanierungskonzeptes.....	71
4.5	Entwicklung des Gesamtbestandes.....	71

5	Diskussion.....	73
5.1	S. aureus-Identifizierung	73
5.1.1	Phänotypische Verfahren.....	73
5.1.2	genotypische Verfahren.....	74
5.2	S. aureus-Differenzierung.....	74
5.3	Schlussfolgerung für den Gesamtbestand	78
6	Zusammenfassung	81
7	Summary	83
8	Literaturverzeichnis.....	85
9	Anhang	96
9.1	Tabellenverzeichnis	96
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	96
9.3	Zuordnung der Tiere zu Pflege-Typen und Kodierung im Dendrogramm (Tabelle)	97
9.4	Verwendete Chemikalien und Geräte.....	99
10	Danksagung.....	102

Liste der Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata
AGTAM	Arbeitsgruppe Tierarzneimittel
Ak	Antikörper
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BTK	Bundestierärztekammer
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii
evtl.	eventuell
i.E.	internationale Einheiten
IMI	intramammäre Infektion
i.d.R.	in der Regel
inkl.	inklusive
Jh.	Jahrhundert
KbE	Keim-bildende Einheiten
kkW	kulturell kein Wachstum
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
max.	maximal
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MLP	Milchleistungsprüfung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfge	Pulsfeldgelelektrophorese
p.p.	post partum
PNAG	Poly-N-1,6-acetyl Glukosamin
RKI	Robert-Koch-Institut
RP	Regierungspräsidium
Rpm	rounds per minute
s.	siehe
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus, Streptococcus</i>
SCC	somatischer Zellgehalt
sec.	Sekunde
spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
SSR	short sequence repeat
u.ä.	und ähnliches
u.a.	unter anderem
u.w.	und weitere
V	Volt
v.a.	vor allem
VAG	Viertelanfangsgemelk
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Staphylococcus (S.) aureus gehört zu den weltweit bedeutendsten Erregern klinischer und subklinischer Rindermastitiden. Im Hessischen Landeslabor beispielsweise betrug der Anteil an *S. aureus*-Nachweisen in Viertelanfangsgemelken (VAG) im Jahr 2010 ca. 2,5%. Damit handelt es sich mit Abstand um den wichtigsten euterassoziierten kontagiösen Mastitiserreger (Nachweisraten: Streptokokken Lancefield-Gruppe G: 0,05%, *Streptococcus agalactiae*: 0,03%).

In der vorliegenden Studie wurde die Sanierung eines hessischen Milchviehbetriebes mit einer *S. aureus*-Einzeltierprävalenz von anfangs 30% innerhalb eines Zeitraums von 18 Monaten begleitet. Der Sanierungsplan beinhaltete die klassischen Hygienemaßnahmen in Anlehnung an der 5-Punkte-Plan. Ebenfalls wurden die isolierten *S. aureus*-Feldstämme genotypisiert.

Insbesondere die genotypischen Untersuchungen bilden die Grundlage zu Aussagen bzgl. der Verbreitung, Epidemiologie und Virulenz einzelner *S. aureus*- Isolate.

Als Goldstandard hat sich in der Bakteriologie bisher dazu die Pulsfeldgelelektrophorese (Pfge) bewährt (SHOPSIN et al. 1999, STROMMENDER et al. 2006b, MOODLEY et al. 2006). Nachteil dieser Methode ist ein vergleichsweise hoher Arbeits-, Kosten- und Zeitaufwand sowie die nur begrenzt mögliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Untersuchungseinrichtungen. Eine weniger aufwendige Alternative mit vergleichbarem Diskriminierungspotential stellt das Typisieren des Staphylokokken Protein A (*spa*)-Gens dar. Die Ergebnisse dieser Methode sind durch die Sequenzierung eines bestimmten Markergens leicht untereinander vergleichbar und ermöglichen es, über Labor- und Ländergrenzen hinweg z.B. epidemische *S. aureus*-Stämme zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit war es auch, die Ergebnisse der beiden vorgenannten Typisierungsmethoden miteinander zu vergleichen, um die Leistungsfähigkeit der methodisch einfacheren *spa*-Typisierung mit der Pfge zu vergleichen.

Mittels der *spa*-Typisierung wurden zudem weitere 92 verteilt über das gesamte Landesgebiet ausgewählte *S. aureus*-Isolate aus 92 unterschiedlichen hessischen Milcherzeugerbetrieben typisiert, um einen Grundstein für ein mit der EpiMRSA-Datenbank vergleichbares epidemiologisches Werkzeug zu legen.

2 Literaturübersicht

2.1 Mastitis der Rinder

Unter einer Mastitis versteht man im weiteren Sinn eine Entzündung der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden Gewebeanteile. Entzündungen des Euters können als Thelitis (Zitzenentzündung), Galaktophoritis (Entzündung der Milchgänge) oder eben als Mastitis im engeren Sinn (Entzündung des Drüsengewebes) auftreten (SCHULZ 1994). Meist sind jedoch Mischformen zu beobachten, wobei Drüsenparenchym und milchabführende Gewebsanteile gleichermaßen betroffen sind (Galaktophoromastitis).

Gekennzeichnet ist eine Mastitis immer durch einen erhöhten somatischen Zellgehalt (somatic cell count = SCC) des Drüsensekretes. Der SCC von klinisch gesunden Eutervierteln beträgt meist $<10^5$ Zellen pro ml Milch. Die Milch eines entzündeten Euters befindet sich in der Regel in Bereichen $>2 \times 10^5$ Zellen pro ml Milch (DEGO et al. 2002).

Ein Anstieg des SCC von entzündeten Eutervierteln ist abhängig vom Infektionsstatus, dem Laktationsstadium, der Laktationsanzahl einer Milchkuh und exogenen Faktoren wie Transport, Klauenschneiden o.ä. Bei gesunden Eutervierteln ist ein signifikanter Anstieg des SCC nur in den ersten beiden Wochen der Laktation festzustellen (NATZKE et al. 1972, HARMON 1994).

Der SCC ist neben dem Nachweis von euterpathogenen Keimen auch bei der Kategorisierung der Eutergesundheit (DVG, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft 1994) das entscheidende Kriterium. In den „Leitlinien der Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem“ wird die Eutergesundheit folgendermaßen eingeteilt:

Tabelle 2.1: DVG-Kategorien der Eutergesundheit

Beurteilung zytobakteriologisch- mikrobiologischer Befunde im Rahmen der Mastitis- Kategorisierung		
In Anlehnung an IDF, 1967		
Zellgehalt pro ml Milch	Euterpathogene Mikroorganismen	
	nicht nachgewiesen	nachgewiesen
< 100.000	Normale Sekretion	Latente Infektion
> 100.000	Unspezifische Mastitis	Mastitis

Diese Tabelle gilt für die Beurteilung der Untersuchungsergebnisse von

Viertelanfangsgemelkproben von Kühen in der Laktation.

Die Mastitis gehört zu den wirtschaftlich bedeutendsten Erkrankungen der Rinder. Bundesweit (ADR, Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter 2011), so auch in Hessen (WOLTER et al. 1996), ist die Mastitis mit 19,4% die zweithäufigste Abgangsursache für Milchkühe. Da sich der Auszahlungspreis der Milch für die Milcherzeugerbetriebe laut Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Milch (Milch-Güteverordnung, MilchGüV) u.a. nach dem mittleren Keimzahlwert, dem Fett- und Eiweißgehalt und dem SCC richtet und eine Mastitis diese Parameter beeinflusst, treten finanzielle Verluste bei Mastitiden auf (s. auch 2.3.2, MilchGüV, 1980).

2.1.1 Ursachen

Eine Mastitis kann durch chemische, physikalische, infektiöse oder traumatische Faktoren ausgelöst werden. In 15-20% aller Mastitisfälle ist ein Erregernachweis nicht möglich (SCHULZ 1994). COENEN (2000) beschreibt, dass mehr als 95% aller Mastitiden durch fakultativ oder obligat euterpathogene Erreger verursacht werden.

Die Infektion der Milchdrüse erfolgt meist auf galaktogenem Weg, d.h. als aufsteigende Infektion aus oder über den Strichkanal, die Zitzenzisterne oder die Milchgänge, seltener über Wundinfektionen der Euterhaut bzw. der Zitze oder hämatogen, d.h. über den Blutstrom (WEISS 2007).

Die Mastitis ist eine klassische Faktorenerkrankung. Häufig führt erst das Zusammenwirken von endo- und exogenen Stressoren mit Mastitiserregern zu einer Mastitis (WEISS et al. 2000).

Folgende Faktoren können eine Mastitis begünstigen: geschwächtes Immunsystem, Verletzungen der Zitze durch Haltungs- bzw. melktechnische Fehler, erhöhter Keimdruck im Bestand durch schlechtes Stallklima oder mangelhafte Melkhygiene z.B. infolge kontaminierter Melkstandböden durch Fehlen eines Vormelkbeckers, schlechter Ernährungszustand bzw. fehlerhafte Versorgung mit Energie, Vitaminen, Mineralstoffen, etc.

Verlaufsform und klinisches Bild der Mastitis sind im weiteren Geschehen abhängig von der Pathogenität bzw. Virulenz des Erregers, dem allgemeinen Gesundheitszustand des Tieres und dem Funktionszustand der Milchdrüse, also von Faktoren, die zu einer Immunsuppression führen können (WEISS et al. 2000).

2.1.2 Verlaufsformen und klinisches Bild

Die Mastitis wird je nach Dauer der Erkrankung als akut oder chronisch bezeichnet (SCHULZ 1994). Die Mastitis kann - wenn klinisch - durch eine Sinnesprüfung (Kardinalsymptome der Entzündung) oder - wenn nicht klinisch - nur durch labordiagnostische Untersuchungen der Milch erkannt werden (DVG 2009).

Außerdem kann eine Einteilung in Anlehnung an RENK (WEISS 2007) nach den pathologisch-anatomischen Veränderungen erfolgen. Hier werden akute katarrhalisch-eitrige Galaktophoritis und Mastitis, chronische katarrhalische Galaktophoritis und Mastitis, akute bösartige Mastitis, chronische eitrig-abszedierende Mastitis, interstitielle nichteitrig Mastitis und granulomatöse Mastitis unterschieden. Bei diesen vorgenannten Einteilungen steht die Ätiologie der Mastitis jedoch im Hintergrund.

Die Kliniker-Einteilung (Prof. Dr. A. Sobiraj, Leipzig, 08.04.2013) unterscheidet zwischen klinischer Mastitis und klinisch inapparenter Eutererkrankung.

Bei klinischen Mastitiden unterscheidet man die phlegmonösen, apostematösen und katarrhalischen (s. Tab. 2.3). Diese können akut, subakut und chronisch auftreten, je nach Ausprägung der Entzündungssymptome. Liegen alle Kardinalsymptome einer Entzündung vor, so spricht man von einer akuten Mastitis. Haben bereits Heilungsprozesse eingesetzt und sind folglich nicht mehr alle Kardinalsymptome vorhanden, handelt es sich um eine subakute Mastitis. Chronische Mastitiden sind nicht zur klinischen Ausheilung gekommen.

Nicht klinische Mastitiden verlaufen i.d.R. chronisch (s. Tab. 2.2). Hier können die subklinische Mastitis von der unspezifischen (subklinische) Mastitis und von der latenten Infektion unterschieden werden (s. auch Tab. 2.1). Bei allen drei Mastitistypen werden keine Veränderungen des Allgemeinbefindens, bei der Euteradspektion bzw. -palpation und der Milch festgestellt.

Tabelle 2.2: Kliniker-Einteilung klinisch inapparenter Eutererkrankungen/Abgrenzung zur Eutergesundheit nach Prof. Dr. A. Sobiraj, Leipzig, 08.04.2013

Mastitistyp	ZZ	Bakteriologische Untersuchung
Subklinische Mastitis	++(+)	+
Unspezifische (subkl.) Mastitis	++(+)	-
Latente Infektion	-	+
Gesundes Euterviertel	-	-

Tabelle 2.3: Kliniker-Einteilung klinischer Mastitiden nach Prof. Dr. A. Sobiraj, Leipzig, 08.04.2013

Mastitistyp	Störung Allgemeinbefinden	Euteradspektion	Euterpalpation	Milchveränderungen	ZZ	Bakteriolog. Untersuchung
Phlegmonöse Mastitis, akut	+++	+++	+++	+++	+++	+
Phlegmonöse Mastitis, subakut	+	+(+)	+(+)	++	+++	+/-
Phlegmonöse Mastitis, chronisch	-	+	+	+	+(+)	+/-
Apostematöse Mastitis, akut	+++	+++	+++	+++	+++	+
Apostematöse Mastitis, subakut	+/-(-)	++	++	++(+)	++(+)	+/-
Apostematöse Mastitis, chronisch	+/-(-)	+(+)	++	+(++)	++(+)	+/-
Katarrhalische Mastitis, akut	-	++	++(+)	++	++(+)	+
Katarrhalische Mastitis, subakut	-	(+)/-	+(+)	+(+)	++	+
Katarrhalische Mastitis, chronisch	-	-	+	+/-	+(+)	+
Unspezifische chron.-kat. Mastitis	-	-	+/-	+/-	+(+)	-

2.1.3 Mastitis als Bestandsproblem

Da die Mastitis eine Faktorenerkrankung ist, liegt es nahe, dass diese Faktoren z.T. den gesamten Bestand beeinflussen. Faktoren wie fehlerhafte Fütterung und mangelhafte Haltungsbedingungen, die z.B. u.a. einen erhöhten Keimdruck verursachen können, erhöhen die Krankheitswahrscheinlichkeit für jedes Einzeltier im Bestand. Bei diesen Faktoren kann man solche, die durch differente Empfänglichkeiten der Einzeltiere wirksam werden (z.B. Zitzenverletzungen), unterscheiden von solchen, die zu einer verminderten Leistung des Immunsystems der Tiere im gesamten Bestand führen, also herdenspezifisch sind (z.B. Energiemangel durch Fütterungsfehler).

Auf ein Mastitisproblem deutet laut DVG (2009) das Ergebnis von mindestens zwei zytobakteriologischen Untersuchungen innerhalb eines Jahres hin, wenn mehr als fünf Neuinfektionen pro 100 Viertel festgestellt werden.

Da es mit hohem Aufwand verbunden ist, in jedem Betrieb zweimal jährlich eine zytobakteriologische Gesamtbestandsuntersuchung durchzuführen, werden die monatlichen

Ergebnisse im Rahmen der Gütebewertung (Zellgehalte der Anlieferungsmilch) hilfsweise verwendet, um eine zumindest tendenzielle Entwicklung der Eutergesundheit zu erkennen. Hierbei müssen regionale Unterschiede, aber auch die Rasse, die Herdengröße und die Haltungsform berücksichtigt werden. Es wird empfohlen, den Trend der Eutergesundheit einer Herde anhand des gleitenden geometrischen Mittelwertes aus mehreren Untersuchungen der Anlieferungsmilch zu beurteilen (DVG 2009).

Problematisch bei der Aussage über die Herdengesundheit anhand des SCC der Bestandsmilch ist allerdings, dass hohe Prävalenzen von klinischen Erkrankungen trotz allgemein niedriger Zellgehalte der Herdensammelmilch dadurch übersehen werden, insbesondere wenn es sich um große Bestände handelt (ERSKINE et al. 1988). Auch unabhängig von der Größe des Bestandes kann die Aussage über die Eutergesundheit durch sekretorische Einflüsse (Rasse, Laktationsstadium, Alter der Tiere, Futterinhaltsstoffe, Art der Mastitiserreger, Mastitisprävalenz, Anteil klinischer Fälle und Lokalisation der Erreger) sowie durch nicht sekretorische Einflüsse (Analytik, Probennahme, Transport und Lagerdauer der Proben, Milchanteil erkrankter Kühe, Melkintervall, Ausmelkgrad und exogene Stressoren) bei der Beurteilung der Bestandsmilch-Zellzahl verzerrt werden (HAMANN.1992).

2.2 Mastitiserreger

Eine Mastitis wird in erster Linie durch Bakterien verursacht, seltener durch Hefen oder Algen. In den wenigen Fällen, in denen Viren in der Milch nachgewiesen werden können, handelt es sich meist um eine Allgemeininfektion, bei der das Euter miterkrankt ist.

Zu einer Infektion der Milchdrüse durch bakterielle Erreger kommt es meistens dann, wenn die Zitzenkuppe bzw. der Strichkanal zunächst kontaminiert wurden, es zu einer Vermehrung des Erregers kommt und dieser dann über die Zitzenzisterne in das Drüsengewebe aufsteigen kann (ANDERSON 1982).

Die Mastitiserreger werden nach ihren unterschiedlichen epidemiologischen Eigenschaften in zwei Hauptgruppen unterteilt: major-pathogene Erreger, die entweder umweltassoziiert (Umweltmastitiserreger) oder euterassoziiert (kontagiöse Mastitiserreger) sind, und minor-pathogene Erreger.

2.2.1 Umweltmastitiserreger

Die am häufigsten isolierten umweltassoziierten Erreger sind *Streptococcus spp.* (außer *S. agalactiae* und *S. canis*), *Escherichia (E.) coli* und coliforme Keime (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter aerogenes*) (SMITH et al. 1985).

Hauptvertreter der Streptokokken als Mastitiserreger sind *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae* und verschiedene Enterokokkenspezies. Bis auf *S. dysgalactiae* haben alle diese Bakterien gemein, dass sie das Glykosid Äskulin spalten können und somit die Gruppe der Äskulin-positiven Streptokokken bilden.

Die umweltassoziierten Mastitiserreger sind nicht auf das Euter als Reservoir angewiesen, sondern sind hauptsächlich in der Umwelt, d.h. ubiquitär (in Einstreu, im Staub, auf der Haut, im Darm, auf Tonsillen etc.) nachweisbar. Gerade das Einstreumaterial ist ein geeigneter Lebensraum für diese Keime, wobei je nach Einstreu unterschiedliche Bakterien vorherrschen. Stroh z.B. ist ein besonders geeigneter Lebensraum für Streptokokken, Sägemehl z.B. eher für Klebsiellen (ZEHNER et al. 1986).

Die Kontamination der Zitzenkuppe bzw. des Strichkanals durch umweltassoziierte Erreger findet in der Regel in der Zwischenmelkzeit statt und stellt besonders ein Problem in Betrieben mit hoher Keimbelastung durch hygienisch schlechte Haltungsbedingungen bei gleichzeitig geschwächtem Immunsystem der Tiere dar. Daraus ergibt sich, dass die Bekämpfung dieser Mastitisform hauptsächlich darauf ausgelegt ist, eine möglichst geringe Exposition der Zitzen mit den Erregern bei gleichzeitiger Optimierung der körpereigenen Abwehr zu erreichen (TODHUNTER et al. 1991, SMITH und HOGAN 1993).

Nach SMITH und HOGAN (1993) sind Umweltmastitiserreger häufiger Verursacher klinischer Mastitiden als kontagiöse Erreger. Diese klinischen Mastitiden sind allerdings i.d.R. von relativ kurzer Krankheitsdauer. Als Ausnahme beschreibt HUGHES (1999), dass *S. uberis* z. T. in der Lage ist, lange im Euter zu persistieren, somit auch von Beginn an subklinische chronische Mastitiden verursachen kann.

2.2.2 Kontagiöse Mastitiserreger

Hauptvertreter dieser Erregergruppe sind *S. aureus*, *S. agalactiae*, andere β -hämolisierende Streptokokken der Serogruppen C, G und L und einige Mykoplasmaspezies (SMITH et al. 1985). *S. aureus* ist der weltweit am häufigsten auftretende und damit wichtigste Vertreter der euterassoziierten, kontagiösen Mastitiserreger (SOBIRAJ et al. 1997, KÖSTER 2005, TENHAGEN

et al. 2009).

Im Gegensatz zu den Umweltmastitiserregern liegt das Hauptreservoir dieser Erregergruppe im Euter selbst und/oder in Verletzungen der Zitzen- bzw. Euterhaut; der Hauptübertragungsweg erfolgt mechanisch von Viertel zu Viertel, und die Infektion erfolgt überwiegend kurz vor, während oder kurz nach der Melkzeit. Die Erreger in infizierten Eutervierteln werden mit der Milch ausgeschieden und so auch in der Umwelt verbreitet. Ein gesundes Viertel wird infiziert, weil Melkgegenstände wie Vormelkbecher, Reinigungstücher, Melkzeuge oder auch die Hand des Melkers Vektoren für die Erreger darstellen. Durch technische Fehler während des eigentlichen Melkvorganges kann es ebenfalls zu Infektionen kommen: Durch Lufteinbrüche z.B. kann kontaminierte Milch innerhalb des Melkzeugs zurückfließen oder durch eine fehlerhafte Pulsatorfunktion bzw. Vakuumschwankungen können die Erreger in den Strichkanal gelangen.

Daraus ergibt sich eine Bekämpfungsstrategie, die sich hauptsächlich auf die Minimierung der Kontaminationsgefahr während der Melkzeit abzielt (z.B. Zitzendippen mit DVG-zugelassenen Dippmitteln, Verwendung von Einmaltüchern zur Zitzenreinigung, Benutzung eines Vormelkbeckers, Zwischendesinfektion des Melkzeugs, etc. (HOEDEMAKER 2001a)).

Der Erfolg einer Behandlung von Mastitiden mit Antibiotika ist wiederum von den beteiligten Erregern abhängig. Bei der Therapie unterscheidet man zwischen einer Laktationstherapie und dem Trockenstellen unter antibiotischem Schutz. Durch Einsatz von Antibiotika während der Laktation konnte bei Mastitiden durch *S. agalactiae* eine Heilungsrate von über 90% erreicht werden (WILSON et al. 1999). Dagegen ist der Erfolg einer antiinfektiven Therapie bei einer *S. aureus*- Mastitis während der Laktation eher mäßig zu beurteilen. In einer Studie wurden Heilungsraten abhängig von z.B. Applikationsform, Immunstatus des Tieres, Resistenzentwicklung zwischen 20-70% beschrieben (KASCHE 1995).

Die kontagiösen Mastitiserreger können neben klinischen gleichermaßen von Beginn an subklinische, chronische Mastitiden verursachen (BRAMLEY und DODD 1984). Die Erreger werden oftmals nicht kontinuierlich ausgeschieden und können sich (v.a. *S. aureus*) im Drüsengewebe abkapseln (s. 2.3). Dort persistieren sie z.T. über Monate und werden auch in der Trockenstehphase nicht zwingend eliminiert (s. 2.3).

2.2.3 Minor-pathogene Mastitiserreger

Zu diesen Erregern zählen *Corynebacterium (C.) bovis* und *Staphylococcus spp.* (außer *S. aureus* und *Micrococcus spp.*). Die Staphylokokken dieser Gruppe (*S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. chromogenes* u.w.) reagieren im Plasmakoagulasetest meist negativ und werden deshalb auch als Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) zusammengefasst.

Die hier genannten Staphylokokken werden zu den Umweltmastitiserregern gezählt, während *C. bovis* als euterassoziert angesehen wird (BRAMLEY und DODD 1984).

Als Unterscheidungsmerkmal zu den Major-pathogenen (s. 2.2.1 und 2.2.2) kann man festhalten, dass die Minor-pathogenen zwar auch subklinische Mastitiden hervorrufen können, diese dann allerdings gemessen am SCC milder verlaufen (RÖDER 1985). Es wird z.T. davon ausgegangen, dass die Minor-Pathogenen sogar zur physiologischen Strichkanalsflora zählen, ohne zwingend eine Mastitis zu verursachen (WOLTER et al. 2003).

Des Weiteren wurde in verschiedenen experimentellen Studien sogar ein protektiver Effekt durch die Minor-Pathogenen gegenüber den Major-Pathogenen festgestellt. In einer Herde mit einer hohen Prävalenz minor-pathogener Mastitiserreger treten weniger Infektionen durch Major-Pathogene auf (MATTHEWS et al. 1991, SCHUKKEN et al. 1999). Dieser Effekt ist möglicherweise u.a. durch den leicht erhöhten SCC und damit eine höhere lokale Abwehrbereitschaft des Viertels zu erklären.

Allerdings findet man in der Literatur auch gegenteilige Beobachtungen. HOGAN (1988) beschreibt einen progressiven Infektionsverlauf durch Umweltstreptokokken in mit minor-pathogenen besiedelten Vierteln im Vergleich zu Vierteln ohne minor-pathogene Erreger.

2.3 *S. aureus* als Mastitiserreger

S. aureus gehört unter den Bedingungen einer intensiven Milchproduktion weltweit zu den bedeutendsten Erregern subklinischer Rindermastitiden. In den sechziger Jahren noch spielte die Staphylokokkenmastitis eine relativ untergeordnete Rolle, heutzutage weist man in bis zu 10,9% aller untersuchten Viertelgemelksproben *S. aureus* nach (WAAGE et al. 1999). In anderen Untersuchungen werden Prävalenzen von 5,7%, 6,3% beschrieben (McDOUGALL 1998, TENHAGEN et al. 2006).

Da der Erreger Kasein hydrolysieren und Laktose fermentieren kann, ist Milch ein besonders geeignetes Nährmedium für das Wachstum von *S. aureus* (DEGO et al. 2002). Deshalb sind auch

infizierte Euterviertel als Hauptreservoir für *S. aureus* im Bestand anzusehen. Melkzeug, Eutertuch und/oder Hände des Melkers dienen als Überträger der Erreger von infizierten auf gesunde Euterviertel.

Die Infektion eines Viertels erfolgt meist über den Strichkanal (s. 2.2). Im weiteren Infektionsgeschehen besiedelt der Erreger die Epithelzellen der Drüsenzisterne und der Milchgänge. Nach dieser selektiven Adhärenz, die auf Interaktionen zwischen Oberflächenstrukturen der Bakterien und Rezeptoren der Wirtszelle zu beruhen scheint, folgt eine Phase der Vermehrung und Ausbreitung der Erreger (GEDEK et al. 1993). Während der Ausbreitungsphase, die v.a. durch Pathogenitätsfaktoren wie Hämolysine, Leukozidine, Staphylokinase und Hyaluronidase begünstigt wird, werden die Alveolarzellen befallen, die dann von spezifischen Abwehrzellen umgeben werden. Bei diesen Abwehrzellen handelt es sich um Leukozyten (v.a. polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Monozyten), die durch Verlangsamung des Blutstromes am Endothel „kleben“ bleiben (Adhäsion) und dann ins extravasale Gewebe übertreten (Emigration). Sie wandern gezielt in Richtung des Entzündungsherdes (Chemotaxis) - angelockt durch die Chemotaxine.

Im Verlauf der chronischen-eitrigen Entzündung nimmt die Zahl der Granulozyten ab, während die Zahl der mononukleären Zellen ansteigt und durch die Proliferation von Bindegewebe eine chronisch-proliferative Entzündung entsteht. Diese Proliferation des Bindegewebes dient der Abgrenzung (Demarkation) des durch proteolytische Enzyme der Granulozyten nekrotischen Gewebes und der Bakterienansammlung. Es entsteht ein Abszess, der von Granulationsgewebe umgeben ist. Das Granulationsgewebe besteht primär v.a. aus Fibroblasten bzw. -zyten und Angiofibroblasten. Im weiteren Verlauf überwiegen Kollagenfasern (WEISS 1990).

Eine wirksame Eliminierung der Bakterien kommt im Fall der durch *S. aureus* ausgelösten Entzündungsreaktion meist nicht zu Stande, und die lebensfähigen Staphylokokken verbleiben in den abgekapselten Knoten, auch als Granulome bezeichnet, die bei einer Euterpalpation tastbar werden können. Diese Knötchen stellen auf unterschiedliche Weise eine Gefährdung dar. Zum einen können durch Aufbrechen der Granulome die darin befindlichen vitalen Erreger wieder freigesetzt und anschließend ausgeschieden werden, d.h. die Infektionsquelle bleibt vorhanden, zum anderen werden die Erreger diskontinuierlich freigesetzt, d.h. das Viertel wird zunächst zeitweise evtl. nicht als infiziert erkannt (WOLTER et al. 2000).

Die Euterentzündungen durch *S. aureus* manifestieren sich meist in Form einer katarrhalisch-

eitrigen Mastitis und Galaktophoritis, die in der Regel chronisch und subklinisch verläuft. Aber auch akute bis perakute klinische Fälle können bei neu in den Bestand eingestellten Kühen oder bei Kühen, die durch andere Infektionen ein geschwächtes Immunsystem haben, beobachtet werden. Auffallend ist, dass besonders postpartal das „Aufflackern“ einer akuten *S. aureus* bedingten Mastitis beobachtet werden kann, insbesondere dann, wenn der Erreger in der Trockenstehphase nicht vollständig eliminiert werden konnte (GEDEK et al. 1993a).

2.3.1 Taxonomie und genetische Untersuchungen

S. aureus gehört wie alle Bakterien der Gattung *Staphylococcus* zur Familie der *Micrococcaceae*. Es handelt sich bei den Staphylokokken um gram-positive, kugelförmige Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 μm (GEDEK et al. 1993). Der Gattungsname erklärt sich durch die traubenförmige Anordnung der Zellen im mikroskopischen Präparat (staphyle = griechisch für Weintraube). Die Speziesbezeichnung entstand durch die goldgelbe Pigmentierung der Kolonien, die allerdings nicht bei allen Stämmen zu finden ist. Staphylokokken sind fakultative Anaerobier und lassen sich besonders auf Blutagar (in der Mastitisdiagnostik vorzugsweise Rinderblutagar) unter aeroben Bedingungen bei 37°C problemlos anzüchten (GEDEK et al. 1993a).

Die Gattung *Staphylococcus* kann unterteilt werden in Koagulase-positive (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. lutrae* und *S. schleiferi* ssp. *coagulans*) (GEDEK et al. 1993a, FOSTER et al. 1997) und Koagulase-negative Stämme wie u.a. *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. hämolyticus*, *S. hyicus*, *S. capitis*, *S. simulans* und *S. chromogenes* (GEDEK et al. 1993a). Koagulase ist ein Enzym, das zu einer Koagulation von Plasma (vorzugsweise Kaninchenplasma) führt und in der Diagnostik als Differenzierungsmerkmal herangezogen wird, da Koagulase-positive Stämme bzgl. ihrer Pathogenität bedeutender zu sein scheinen.

Bei den Koagulase-positiven Staphylokokken kann man eine weitere Differenzierung anhand der Voges-Proskauer-Reaktion vornehmen (*S. aureus*: positiv *S. intermedius*: negativ).

S. aureus wächst auf festen Nährböden als glatte, unregelmäßig goldgelbe und feucht glänzende, ca. 2-3 mm große Kolonie mit verschiedenen Hämolyseformen (GEDEK et al. 1993). Man findet α -, β -, γ - und δ - Hämolsine, die sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf Erythrozyten unterscheiden. Dem α - und β - Hämolsin scheint bei der Virulenz von *S. aureus* eine Hauptrolle zuzukommen. Das α -Hämolsin bewirkt auf Blutagar nach einer Inkubationszeit von 18 bis 24 Stunden bei 37°C eine breite, vollständige Hämolyse und kommt vorwiegend bei *S. aureus*-

Stämmen des Menschen vor. Es wird in 20 bis 50 % aller Stämme gefunden (ELEK et al. 1950). Bei bovinen Stämmen überwiegt das β -Hämolysin, welches unter identischen Wachstumsbedingungen eine unvollständige Hämolysen verursacht. Dieses Hämotoxin wird von 75 bis 100 % der Stämme produziert (POUTREL et al. 1979). Das δ -Hämolysin, isoliert von *S. aureus*-Stämmen von Mensch und Tier, bewirkt eine schmale, scharf begrenzte, vollständige Hämolysen.

Da von einem identischen Stamm verschiedene Hämolysine gleichzeitig gebildet werden können und diese evtl. in Wechselwirkung untereinander treten, ist der Hämo-Toxinnachweis allein durch das Hämolysenbild problematisch (MARTIN und BERGMANN 1994).

Bezogen auf die diagnostische Aussage von Hämolysenformen bei *S. aureus*-Isolaten aus der Kuhmilch ist festzustellen, dass bei eindeutiger β -Hämolysen auf Blutagar keine weitere biochemische Untersuchung auf *S. aureus* erfolgen muss. Liegt keine β -Hämolysen vor, so sind entweder die Nachweise des Clumping-Factors, der Koagulase oder der Einsatz eines kommerziellen Testsystems erforderlich, um zwischen *S. aureus* einerseits und Mikrokokken bzw. KNS andererseits zu unterscheiden (DVG 2009).

Innerhalb der Spezies (spp.) *S. aureus* kann durch unterschiedliche phänotypische Merkmale eine Differenzierung in Biotypen durchgeführt werden. So erfolgt beispielsweise die Einteilung in Subspezies (ssp.).

Der überwiegende Teil der aus Kuhmilch isolierten *S. aureus*-Stämme wurde von MEYER (1966) der Subspezies *bovinus* zugeordnet. Als unterscheidbare Merkmale untersuchte der Autor folgende Reaktionen: Koagulation von humanem und bovinem Plasma, Wachstum auf Kristall-Violett-Agar, Hämolysentyp, Fibrinolysin-Nachweis und Empfindlichkeit gegenüber Phagen der Gruppe IV. In einer erweiterten Untersuchung (inkl. Nachweis der Pigmentbildung, der Telluritreduktion und des Clumping-Factors) zur Klassifikation der *S. aureus*-Feldstämme konnten sechs wirtsspezifische *S. aureus*-Biotypen (A-F) differenziert werden, wobei Biotyp C bei Rind und Schaf vorherrscht (HÁJEK und MARSÁLEK 1971). Mittlerweile wurden allerdings die Biotypen E und F der Spezies *S. intermedius* zugeordnet, da sich durch weitere Untersuchungen eindeutig abweichende Eigenschaften zur Spezies *S. aureus* zeigten (HÁJEK und MARSÁLEK 1976).

Eine weitere Unterscheidung einzelner Stämme ist durch das Vorhandensein verschiedener Enterotoxine möglich.

Die Enterotoxine der Staphylokokken sind extrazelluläre Proteine, die von verschiedenen Staphylokokken-Stämmen (insbesondere aber *S. aureus*) gebildet werden. Sie sind hitzestabil, wirken als potentes Toxin im Gastrointestinaltrakt, aber auch als Superantigen. Diese superantigene Wirkung verursacht u.a. eine unspezifische T-Zell-Proliferation. Die Staphylokokken-Enterotoxine (SE) stellen eine unspezifische Bindung zwischen der V β -Kette des T-Zell-Antigen-Rezeptors (TCR) auf T-Zellen und dem MHC-II-Komplex auf Antigen-präsentierenden Zellen her und aktivieren somit die T-Zellen unspezifisch. Physiologischerweise ist an das MHC-Molekül ein spezifisches Antigen gebunden, das nur von spezifischen TCR erkannt werden kann und danach zu einer T-Zell-Proliferation führt. In der Folge kommt es zu einem massiven Zytokinanstieg gegebenenfalls mit den klinischen Folgen eines sogenannten Toxic-Shock-Syndroms (BALABAN et al. 2000, DINGES et al. 2000).

Unterschieden werden die Enterotoxine in fünf klassische SE A-E und weitere Enterotoxine SE G bis SE V (YARWOOD et al. 2002, LETERTRE et al. 2003, OMOE et al. 2003, ORWIN et al. 2003, HATA et al. 2006, THOMAS et al. 2006). Es können auch Kombinationen der verschiedenen Enterotoxine in einem Isolat auftreten.

Von den klassischen SE wird bei Lebensmittelvergiftungen des Menschen vorwiegend das SE A nachgewiesen. In einer Untersuchung in den USA lag der Prozentsatz von SE A bei Lebensmittelvergiftungen bei 77%, gefolgt von SE D mit 37% und SE B mit 10% (BALABAN et al. 2000).

Die Häufigkeit der SE A-E von *S. aureus*-Stämmen, die aus bovinen Mastitiden isoliert wurden, wird in der Literatur sehr unterschiedlich beschrieben. AARESTRUP et al. (1995) konnten bei 106 *S. aureus*- Stämmen von bovinen Mastitiden aus 106 verschiedenen Betrieben keine SE-bildenden Stämme isolieren. HÁJEK und MARSÁLEK (1973) fanden unter 79 *S. aureus*-Isolaten aus mastitiskranken Kühen nur einen SE C-bildenden Stamm. In einer türkischen Studie, in der von 480 Milchproben von Kühen mit subklinischen Mastitiden 106 *S. aureus*-Stämme isoliert und auf das Vorhandensein von SE A-D untersucht wurden, konnten 25 SE A-bildende und 2 SE B-bildende Stämme gefunden werden. SE C- und SE D-Bildner konnten nicht nachgewiesen werden (BOYNUKARA et al. 2008). In einer Untersuchung mit 262 *S. aureus*-Isolaten aus Milchproben verschiedener Herden konnte bei 75 Isolaten (28,6%) ein SE nachgewiesen werden, wobei 44 Mal SE C, 58 Mal SE D, einmal SE A und sieben Mal SE B auftrat. SE E konnte nicht nachgewiesen werden (KENNY et al. 1993).

Aus hessischen Milchviehherden wurden 76 *S. aureus*-Isolate aus Milchproben auf das Vorhandensein von SE- Genen getestet. Es wurde weder das *sea*- noch *seb*-Gen gefunden; in 14 Isolaten konnte das *sec*-Gen gefunden werden, bei 3 Isolaten das *sed*-Gen und bei einem Isolat das *see*-Gen (EISSA 2007).

ZSCHÖCK et al. (2005) fanden mittels PCR in 104 zufällig ausgewählten *S. aureus*-Stämmen aus bovinen Mastitiden 61 (58,7%) SE G-J-bildende Isolate. 13 Kulturen beinhalteten lediglich ein SE, 28 zwei, 12 drei und acht sogar vier SE. 36 Feldstämme produzierten das SE G, 22 SE I, 23 SE J. SE H wurde in keinem der 61 Stämme detektiert. Eine Kombination von *sei*- und *seg*-Genen wurde in 14 (23%) Stämmen gefunden. In 10 (16,4%) Isolaten konnte das Vorhandensein von *sei*- und *seg*-Genen nachgewiesen werden. Die Verteilung der klassischen SE A-E zeigte SE B bei einem, SE C bei 20 und SE D bei 15 Isolaten. SE A und SE E wurden nicht nachgewiesen. Des Weiteren wurden die Isolate auf das Vorhandensein des *tst*-Gens (s.u.) untersucht. Es wurde in 20 Stämmen gefunden.

Den Enterotoxinen ist gemeinsam, dass sie akute (z.B. Lebensmittelvergiftungen) und langfristige Effekte (z.B. Störung der Abwehrmechanismen des Wirtes) auf das Immunsystem des Wirtes haben können.

Die Wirkung der SE auf das Immunsystem kann mitogen oder antiproliferativ verlaufen. Die mitogene Wirkung zeigt sich bei verschiedenen T-Lymphozyten, die zur vermehrten Zytokin-Produktion angeregt werden. Die Zytokine beeinflussen dann wiederum verschiedene Abwehrzellen mit günstiger oder auch schädigender Wirkung, da eine überschießende Zytokinproduktion erhebliche Gewebsschädigungen mit sich bringen kann (KENNY et al. 1993, NILSSON et al. 1999). Die antiproliferative Wirkung beruht auf einer Hemmung der Plasmazelldifferenzierung und somit einer verminderten Antikörper-(AK)-Bildung. Des Weiteren wird durch SE die zelluläre Immunantwort unterdrückt (NILSSON et al. 1999) bzw. kann sogar durch massive Beeinflussung der T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden (z.B. Makrophagen, B-Lymphozyten) Zellen ausbleiben (MURAILLE et al. 1997).

Durch die hohe Tenazität der Enterotoxine bzgl. Temperatur und Proteolyse können sie sowohl die Hitzebehandlung der Lebensmittel (z.B. Pasteurisierung) als auch die Magenpassage des Konsumenten überstehen. Milch von Tieren mit Staphylokokken-Mastitis ist die häufigste Quelle der Lebensmittelvergiftungen durch SE tierischen Ursprungs (ORDEN et al. 1992).

Ein weiteres relevantes Toxin, das nicht nur von *S. aureus*, sondern auch von einigen Streptokokken der Lancefield Gruppe A gebildet wird, ist das Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1).

Das Toxic Shock Syndrome (TSS) tritt vorwiegend bei jungen Frauen auf, die Tampons benutzen, und ist charakterisiert durch hohes Fieber, Erythem, Hypertonie oder Schock.

Es besteht z.T. eine Homologie in der Aminosäuresequenz von TSST-1 und den SE (JOHNSON et al. 1991). Weltweit wurden *S. aureus*- Isolate mit dem TSST-1 aus humanen und tierischen Proben gefunden. Die Häufigkeit des TSST-1 in Isolaten aus Milchproben Mastitis-kranker Rinder wird in der Literatur zwischen 17,1% - 54,8% beschrieben (ORDEN et al. 1992, KENNY et al. 1993, MÜLLER 1993, ZSCHÖCK et al. 2005, EISSA 2007). Einheitlicher wird beschrieben, dass es sich bei den Mastitiden, aus deren Milchproben TSST-1-positive *S. aureus*-Stämme isoliert wurden, um perakute bis akute Verlaufsformen handelt (KENNY et al. 1993, MATSUNAGA et al. 1993). So kann man schlussfolgern, dass die Toxinbildung einen Einfluss auf die Adhäsion und die Invasion von *S. aureus* hat und somit die Euterpathogenität gesteigert wird (DEGO et al. 2002).

TSST-1 wirkt wie die SE auf Zellen des Immunsystems, indem es T-Lymphozyten unspezifisch aktiviert und zur Stimulierung von Tumor-Nekrose-Faktor α beiträgt (LEE et al. 1991).

Die Intra-Spezies-Differenzierung verschiedener *S. aureus*-Stämme kann auch auf genotypischer Basis erfolgen; u.a. anhand folgender Methoden:

- a) Protein-A-Polymorphismus
- b) Koagulasegen-Polymorphismus

Zu a):

Protein A ist an die Zellwand gekoppelt und über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Es wird von 58,6% - 100% der *S. aureus*-Stämme gebildet (FORSGREN 1970, BRÜCKLER et al. 1981, SLOBODNÍKOVÁ et al. 1995, EISSA 2007). Da es ein sehr konstantes Merkmal von *S. aureus* ist, gilt es auch als taxonomisches Merkmal (MÜLLER 1983, EISSA 2007).

Die Funktion des Protein A ist das Unterbrechen von Opsonisierung und Phagozytose durch die Bindung von Antikörpern, insbesondere Immunglobulin G über das Fc-Fragment. Außerdem kommt es entweder direkt oder durch Fibrinogenbrücken zu Interaktionen zwischen Protein A und zellassozierten Proteinen von Endothelzellen und aktivierten Blutplättchen (PEERSCHKE et

al. 2006).

Das Staphylokokken-Protein A-Gen (*spa*) ist aus mehreren strukturell und funktionell verschiedenen Regionen aufgebaut. Am N-terminalen Ende befinden sich eine Signalsequenz und fünf IgG-bindende Einheiten (A-D). Die zellwandassoziierte X-Region, die wiederum in zwei Abschnitte (X_r und X_c) unterteilt ist, befindet sich am C-terminalen Ende des DNA-Abschnittes. Der X_r -Bereich besteht aus einer Sequenz von meist 24 Basenpaaren (bp) (SSR = short sequence repeat), die sich unterschiedlich häufig wiederholt (3 bis 15 Wiederholungen). Allerdings sind auch *spa*-Gene bekannt, in denen die repeats aus 21 - 27 bp bestehen. Der X_c -Bereich dieser Region übernimmt die Funktion der Zellwandassoziation (SHOPSIN et al. 1999).

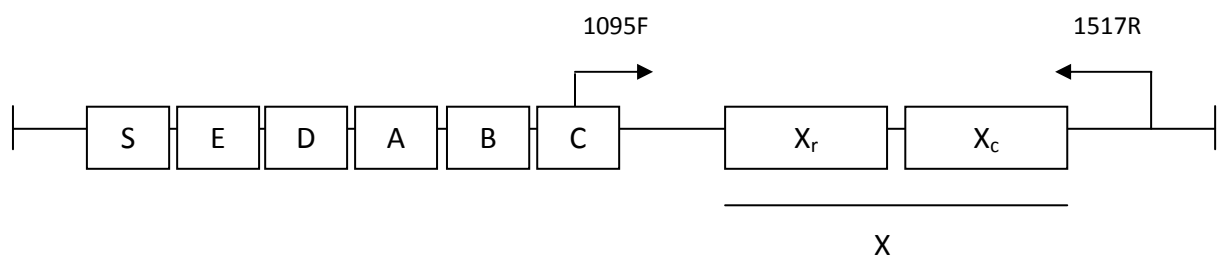


Abbildung 2.1: Aufbau des Protein- A- Gens. Die Kästchen symbolisieren einzelne Genabschnitte; S= Signalsequenz, A-D= IgG-bindende Region, E= zu A-D homologe Region, X= X_r (SSR-Region) + X_c (zellwandassoziierte Region). (SHOPSIN et al. 1999)

Die Funktion der X_r -Region ist bisher weitestgehend unbekannt. Diskutiert wird über eine Korrelation zwischen epidemischem Charakter von *S. aureus*-Isolaten und der Anzahl SSR's. In einer von FRÉNAY (1994) durchgeführten Untersuchung an menschlichem Untersuchungsmaterial zeigten *S. aureus*-Stämme mit acht oder mehr SSR's einen epidemischen Charakter. Diese Beobachtung konnte bei Stämmen mit sieben oder weniger SSR's nicht gemacht werden (FRÉNAY et al. 1994). Diese Aussage widerlegen allerdings HOEFNAGELS-SCHUERMANN (1997) und EISSA (2007), in deren Ergebnissen sowohl epidemische als auch sporadische Ausbreitungseigenschaften bei Isolaten mit neun bis elf SSR's beschrieben sind.

Zu b):

Die Funktion der Koagulase besteht darin, durch die Bindung von Prothrombin das „Staphylothrombin“ entstehen zu lassen. Dieses bewirkt als proteolytischer Komplex die Abspaltung der Fibrinpeptide A und B vom Fibrinmolekül und damit durch Polymerisation des

Fibrinogens die Koagulation des Plasmas (BJERKETORP. 2004). Die Bildung eines Fibrinwalls hat eine wichtige Schutzfunktion für die Staphylokokken vor den zellulären und humoralen Abwehrmechanismen des Wirtes.

Es werden acht verschiedene Serovarietäten beobachtet (TAKESHIGE et al. 1983).

Der Koagulase-Gen-Polymorphismus tritt durch verschiedene Allele des Koagulase-Gens auf.

Das Gen besteht aus einer Prothrombin-bindenden Region, die sich am N-terminalen Ende befindet und aus einer variablen Region, die aus einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen bestimmter Sequenzen besteht und am C-terminalen Ende liegt. Anhand dieser variablen Region können die Isolate in Subtypen unterteilt werden (FRÉNAVY et al. 1994, VIMERCATI et al. 2006).

Zur Abklärung von Verwandtschaftsverhältnissen verschiedener Stämme eignen sich unterschiedliche Typisierungsmethoden. Diese dienen epidemiologischen Untersuchungen und lassen Aussagen über Infektionsketten und -quellen zu.

Verschiedene Typisierungsmethoden sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.4: Die genotypischen Typisierungsmethoden beurteilt nach den Primärkriterien; Tab. modifiziert nach Wichelhaus et al. (2000)

Methode	Typisierbarkeit	Reproduzierbarkeit	Diskriminierungspotenzial
Plasmid-Analyse	Variabel	Gut	Mäßig
Restriktionsenzym-Analyse (REA)	Alle	Mäßig bis gut	Gut
Ribotypisierung	Alle	Gut	Gut
Pulsfeldgelelektrophorese (Pfge)	Alle	Gut	Exzellent
PCR-RFLP	Alle	Gut	Mäßig bis gut
Random amplified polymorphic DNA (RAPD)	Alle	Mäßig	Gut bis exzellent
Rep-PCR	Alle	Gut	Gut
Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus (AFLP)	Alle	Gut	Gut
Sequenzierung (MLST, <i>spa</i> -typing)	Alle	Gut	Exzellent

Zur Bewertung der einzelnen Methoden können Primär- und Sekundärkriterien verglichen werden. Primärkriterien sind die Typisierbarkeit (= eindeutig positive Ergebnisse), die Reproduzierbarkeit (= Wiederholungsergebnis ist identisch mit dem vorangegangenen) und das Diskriminierungspotential (= Differenzierungsmöglichkeit unterschiedlicher Stämme).

Zu den Sekundärkriterien zählen die Interpretierbarkeit der Ergebnisse, die Durchführbarkeit der Methode, der Kostenaufwand und der Grad der Automatisierung und Standardisierung (WICHELHAUS et al. 2000).

Der Goldstandard zur Typisierung von Bakterien und damit auch von *S. aureus* ist nach wie vor die Pulsfeldgelelektrophorese (Pfge) (SHOPSIN et al. 1999, STROMMENDER et al. 2006b, MOODLEY et al. 2006). Bei diesem Verfahren wird die gesamte Bakterien-DNA mittels Restriktionsenzymen (z.B. *Sma*I aus *Serratia marcescens*) an bestimmten Stellen (z.B. zwischen Cytosin und Guanin) gespalten, durch eine Agarosegelelektrophorese mit wechselndem elektrischem Feld (pulsed-field) aufgetrennt. Da diese DNA-Fragmente deutlich mehr Basenpaare enthalten als beispielsweise die Amplifikate einer PCR, muss das elektrische Feld an drei unterschiedlichen Stellen angelegt werden, um ein visuell erkennbares Auftrennen der Fragmente zu ermöglichen. Anschließend werden die DNA-Fragmente durch eine Ethidiumbromidfärbung als Banden sichtbar gemacht. Durch Punktmutationen, Insertionen und Deletionen in der DNA-Struktur zeigen sich unterschiedliche Pfge-Bandenmuster, da die Abfolge der Nukleotide verändert ist und somit neue Restriktionsstellen entstehen.

Anhand des Bandenmusters, das nach der Färbung unter UV-Licht erkennbar wird, können Aussagen über die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Stämme gemacht werden.

Man unterscheidet:

- i) Identische Isolate: Die Muster zeigen die gleiche Anzahl an Banden und die Banden haben alle die identische Größe; es hat kein genetisches Ereignis (z.B. Punktmutation, Insertion oder Deletion) stattgefunden.
- ii) Nah-verwandte Isolate: Die Muster variieren maximal in 2-3 Banden; es hat max. ein genetisches Ereignis stattgefunden.
- iii) Wahrscheinlich-verwandte Isolate: Die Muster variieren in maximal 4-6 Banden; es haben max. 2 genetische Ereignisse stattgefunden.
- iv) Nicht-verwandte Isolate: Die Muster unterscheiden sich in ≥ 7 Banden; ≥ 3 genetische Ereignisse haben stattgefunden (TENOVER et al. 1995).

Ein Nachteil dieser Methode ist der hohe Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand, da die Bakterien zunächst in Agaroseblöckchen gegossen werden müssen und erst dann weitere Arbeitsschritte wie Zellwandlyse, Protein- und Restriktionsverdau etc. erfolgen können.

AKINEDEN et al. (2001) untersuchten 103 *S. aureus*-Isolate aus 60 Mastitis-kranken Kühen in Deutschland mittels Pfg. Die Milchproben stammten aus acht verschiedenen Betrieben. Nach *Sma*I-Restriktionsverdau zeigten sich 12 verschiedene Restriktionsmuster, wobei in jedem einzelnen Betrieb höchstens fünf verschiedene Muster nachgewiesen wurden. Die Pfg-Typen wurden nach den TENOVER-Kriterien beurteilt. Daraus ergab sich, dass es in einem Betrieb jeweils einen vorherrschenden Klon gab. Zum Beispiel wurden aus Betrieb A1 28 *S. aureus*-Isolate untersucht, wovon 26 ein identisches Pfg-Muster zeigten und nur zwei ein davon abweichendes. Aus Betrieb B2 wurden 20 *S. aureus*-Isolate analysiert: Es zeigten sich 15 einheitliche Muster, vier Muster, die eine nahe Verwandtschaft untereinander aufwiesen (Bandenunterschiede in max. ein bis zwei Fragmenten) und ein einzelnes Isolat mit eigenem Pfg-Muster.

Diese Beobachtungen wurden durch weitere Untersuchungen bestätigt (ZSCHÖCK et al. 2000, SOMMERHÄUSER et al. 2003, EISSA 2007).

In einer finnischen Untersuchung lagen 1597 *S. aureus*-Isolate aus zwei Betrieben zur Untersuchung vor, die über einen Zeitraum von 10 Monaten gesammelt wurden (HAVERI et al. 2008). Die Isolate stammten aus Milchproben (n=305), aus der Zitzenumgebung, z.B. Zitzenkanal, Zitzenöffnung etc. (n=911) und aus der Umwelt, z.B. Hautläsionen der Tiere, Zitzengummis, Hände des Melkers etc. (n=381). Aus Betrieb I wurden 99 Isolate mittels Pfg typisiert (38 aus Milchproben, 36 aus der Zitzenumgebung und 25 aus der Umwelt), aus Betrieb II 190 Isolate (21 aus Milchproben, 100 aus der Zitzenumgebung und 69 aus der Umwelt).

Die Ergebnisse der Pfg ergaben für Betrieb I drei verschiedene Typen A1 (n=72), B (n=23) und C (n=1). In einer Milchprobe, einem Strichkanaltupfer und einem Tupfer einer Hautläsion konnten sogar die Typen A1 und B zeitgleich isoliert werden. Typ C wurde aus dem Nasenvorhof eines Melkers isoliert. Es konnte nicht festgestellt werden, dass einer der beiden vorherrschenden Klone (A1 oder B) bevorzugt im Euter bzw. in der Umwelt vorkam.

Im zweiten Betrieb war ein ähnliches Verteilungsbild der Pfg-Typen festzustellen, wobei gegenüber dem ersten Betrieb eine höhere Anzahl unterschiedlicher Pfg-Typen nachgewiesen werden konnte. Dieser Betrieb arbeitete im Gegensatz zu Betrieb I nicht als geschlossenes

System ohne Zukäufe aus anderen Betrieben. Pfg-Typ D (n=168) wurde am häufigsten nachgewiesen. Weitere Pfg-Typen waren F (n=7), B (n=5), A2 (n=4), E1 (n=4), E2 (n=1) und G (n=1). Bei sechs Kühen wurden zeitgleich Stämme von nichtverwandten Pfg-Typen in der Milchprobe und auf der Zitzenhaut bzw. im Zitzenkanal der gleichen Zitze gefunden; der im Euter identifizierte Typ war allerdings auch auf der Haut nachweisbar.

25 kolonimorphologisch unterschiedliche Isolate (Koloniefarbe bzw. Hämolyse) wurden jeweils subkultiviert und zur Pfg-Typisierung herangezogen. Trotz dieser phänotypischen Unterschiede gehörten nur drei dieser Isolate unterschiedlichen Pfg-Typen an.

Schlussfolgernd stellten HAVERI et al. (2008) fest, dass die *S. aureus*-Stämme, die bovine Intramammäre Infektionen (IMI) hervorriefen, weitestgehend genetisch identisch mit den aus der Umwelt isolierten Stämmen waren.

Ein weiterer großer Nachteil dieser Methode ist die mangelnde Vergleichbarkeit von Ergebnissen (Reproduzierbarkeit) zwischen verschiedenen Untersuchungseinrichtungen. Zu dieser Problematik wurde 1998 eine Multicenter-Studie durchgeführt (VAN BELKUM et al. 1998). Dazu wurden 20 bereits charakterisierte *S. aureus*-Isolate (fünf identische, fünf verwandte und 10 nicht verwandte Isolate) an 12 Labore gesendet. Die Durchführung der PCR erfolgte zum Teil anhand von in-house Protokollen, zum Teil nach Standard-Protokollen. Die fünf identischen Isolate wurden von acht Einrichtungen korrekt erkannt. Bei den verwandten Isolaten schnitten fünf Einrichtungen korrekt ab. Die Zuordnung der nicht-verwandten Stämme erfolgte in drei Laboren nicht korrekt. Eine Computer-gestützte Auswertung der Restriktionsmuster der identischen Isolate aus allen Untersuchungseinrichtungen erbrachte eine Übereinstimmung von bis zu 85%. Damit eignet sich die Pfg laut den Autoren mit den damals angewandten Protokollen nicht, um laborübergreifende Vergleichsuntersuchungen durchzuführen.

Eine neuere Methode mit exzellentem Diskriminierungspotential stellt das Sequenzieren unterschiedlicher Genabschnitte dar. Der direkteste und geeignetste Weg der Diskriminierung ist die Sequenzierung des gesamten Genoms. Dieses Verfahren ist allerdings aus arbeitstechnischen, zeitlichen und finanziellen Gründen schwer zu realisieren, sodass es sich anbietet, stellvertretend einen oder mehrere Genabschnitte mit hoher Variabilität bei den unterschiedlichen Stämmen der Spezies zu sequenzieren. Bei diesen Genabschnitten muss es

sich allerdings um Sequenzen handeln, die von hoch konservierten Regionen eingerahmt sind, um die generelle Typisierbarkeit möglichst aller Stämme einer Spezies zu gewährleisten. Außerdem muss die Sequenz des betreffenden Genabschnittes eine Stammspezifität aufweisen.

Beim Multilocus Sequence Typing (MLST) werden sieben sogenannte „housekeeping genes“ von *S. aureus* mittels PCR amplifiziert, danach sequenziert und anschließend analysiert (ENRIGHT et al. 2000).

Die Methode des *spa*-Typisierens beinhaltet lediglich die Amplifizierung und Sequenzierung der X_r -Region des *spa*-Gens und ist deswegen weniger arbeits- und kostenintensiv als das MLST (WICHELHAUS et al. 2000). Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei der X_r -Region um einen hochvariablen Genabschnitt, der aus einer Abfolge sich wiederholender Basenpaare besteht. Durch Deletionen, Insertionen und Punktmutationen entstehen verschiedene Repeatmuster, die eine Repeatnummer erhalten. Aus der Aneinanderreihung der in einem *spa*-Gen vorliegenden Repeatnummern ergibt sich der *spa*-Typ.

z.B. (SCHERPE 2008):

Repeatnummer r12 (24bp): AAA GAA GAC AAC AAC AAG CCT GGT

Repeatnummer r30 (27bp): AAA GAA GAC GGC AAC AAA AAA CCT GGT

Nach der Aneinanderreihung der verschiedenen Repeatnummern einer X_r -Region sieht der *Spa*-Typ z.B. folgendermaßen aus:

t004 : r09 r02 r16 r13 r13 r17 r34 r16 r34

Bei *S. aureus*- Isolaten aus veterinärmedizinischem Untersuchungsmaterial ist der am häufigsten identifizierte *spa*-Typ:

t032 : r26 r23 r23 r13 r23 r31 r29 r17 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28 (MOODLEY et al. 2006, STROMMINGER et al. 2006a)

Der Vergleich von *spa*-Typisierung und Pflge zeigte in der Arbeit von SCHERPE (2008), dass man bei der Bewertung der Typisierungsmethoden zwischen Diskriminierungspotential und epidemischer Aussagekraft der Ergebnisse unterscheiden muss. Es wurden 96 von Menschen isolierte Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA)-Stämme aus einem Hamburger Klinikum mittels Pflge und *spa*-Typisierung untersucht, um zum einen Aussagen über die Anwendbarkeit und Diskriminierungsfähigkeit der Methoden zu machen und zum anderen, um die Interpretation der Ergebnisse im Ausbruchsfall zu vergleichen. Es wurde festgestellt, dass das

Diskriminierungspotential der beiden Methoden vergleichbar ist; die Pfg- Ergebnisse zeigten 16 verschiedene Genotypen, die *spa*-Typisierung 18. Die Typisierbarkeit beider Methoden war mit 100% exzellent. Allerdings weist die Autorin auf Probleme bei der Interpretation der *spa*-Typisierungsergebnisse bzgl. einer Ausbruchssituation hin, da nahverwandte Stämme, die sich nur durch ein genetisches Ereignis unterscheiden, durch die alleinige Zuordnung zu einem *spa*-Typ als nicht verwandt eingestuft werden könnten. Trotz dieser Feststellung waren die Vorteile hinsichtlich der Praktikabilität, der Durchführbarkeit, des Kostenaufwandes, der Standardisierung und Automatisierung sowie der Geschwindigkeit der *spa*-Typisierung so überzeugend, dass nach dieser Arbeit die Routineuntersuchung in dem Labor von der Pfg auf das *spa*-Typisieren umgestellt wurde.

In einer Untersuchung von KOREEN et al. (2004) wurde gezeigt, dass das *spa*-Typisieren bzgl. des Diskriminierungspotentials vergleichbare Ergebnisse liefert wie ein Voll-Genom-Microarray. In dieser Studie wurden 36 *S. aureus*-Stämme aus allen Kontinenten, die über eine Zeit von 40 Jahren gesammelt wurden, mittels *spa*-Typisierens, Microarray, Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) und Pfg untersucht. Die Autoren gingen davon aus, dass der Microarray die präzisesten Aussagen über genetische Variationen treffen kann. Da die Ergebnisse des *spa*-Typisierens vergleichbar mit den Ergebnissen des Microarray waren und das *spa*-Typisieren finanzielle und zeitsparende Vorteile im Vergleich zu den übrigen in dieser Studie angewandten Methoden hatte, wurde darauf hingewiesen, dass eine Untersuchung dieses einzelnen Gens ausreichend ist, um verwertbare genetische Aussagen zu verschiedenen Stämmen machen zu können.

Durch die Anwendung eines Algorithmus (Based upon repeat Patterns = BURP) ist es möglich, verschiedene *spa*-Typen in „Clonal Complexes“ (CC) zusammenzufassen. Da dieser Algorithmus Repeat-Duplikationen, -Deletionen, -Substitution und Basen-Insertion bzw. -Deletion mit einberechnet, kann die Verwandtschaft zwischen den einzelnen *spa*-Typen kalkuliert werden. Dieser Algorithmus ist allerdings nur anwendbar bei Isolaten mit mindestens fünf repeats, da bei diesen Typen keine sicheren Schlussfolgerungen bzgl. der Verwandtschaftsverhältnisse gezogen werden können. STROMMINGER et al. (2006b) verglichen die Ergebnisse dieser *spa*-CC's mit den CC's nach MLST anhand eBURST und den Ergebnissen der Cluster-Analyse nach Makrorestriktionsanalyse mit SmaI und anschließender Pfg. Die Untersuchung von 99 *S. aureus*-Stämmen aus der Stammsammlung des Robert-Koch-Institutes (RKI), Wernigerode,

zeigte eine Übereinstimmung zwischen MLST/eBURST und *spa*-Typisierung/BURP von 96,8% und zwischen Pfg-Cluster-Analyse und *spa*-Typisierung/BURP von 93,4%.

In einer Untersuchung von MOODLEY et al. (2006) wurden 67 MRSA-Stämme von Hunden (n=27), Pferden (n=9), Katzen (n=6), Klinikpersonal (n=22) und aus der Umwelt (n=3) mittels *spa*-Typisierung bzw. Pfg getestet und die epidemiologischen Daten miteinander verglichen, um eine mögliche MRSA-Übertragung zwischen den Tieren und dem Klinikpersonal nachzuweisen. Die Pfg-Ergebnisse zeigten sieben eindeutige Pfg-Typen (A-G), wobei Typ A und B (basierend auf geringen Bandenvariationen) jeweils in Subtypen (A1- A10; B1- B2) eingeteilt werden konnten. Der Typ A gehörte zum CC des in Großbritannien und Irland verbreiteten epidemischen MRSA-15 (CC22-Klon). Alle Isolate von Katzen, 96% der Isolate von Hunden, 82% der Isolate vom Klinikpersonal und ein Isolat von einem Pferd zeigten entweder Pfg-Typ A1 oder waren zumindest nahe verwandt (A2- A10) mit EMRSA-15 (Pfg-Typ A1). Die Typen B, C, D, E und G waren verwandte Isolate von CC8 und waren u.a. bei den restlichen acht Pferden (88%) nachweisbar. Typ F gehörte zum CC72. Diese Ergebnisse lassen die Autoren annehmen, dass sich zwei genetische „Hauptlinien“ der MRSA's in Großbritannien entwickelt haben, denn mit Ausnahme eines Pferdes waren die MRSA-Isolate der Pferde und des Personals in Pferdekliniken (CC8) unterschiedlich im Vergleich zu den Isolaten aus Kleintierkliniken (CC22). Diese Stämme haben sich populationsbezogen verbreitet.

Die Ergebnisse der *spa*-Typisierung zeigten 15 verschiedene Typen, wobei der Typ t032 am häufigsten nachweisbar war (48%). Die BURP-Analyse dieser 15 *spa*-Typen ergab zwei verschiedene *spa*-Gruppen assoziiert mit CC8 und CC22 und einen einzelnen *spa*-Typ, der keinem CC zugeordnet werden konnte. Die gleichen *spa*-Typen wurden bei in epidemiologischem Zusammenhang stehenden Individuen gefunden.

Der Vergleich zwischen den *spa*-CC und den Pfg-Typen zeigte eine vollständige Übereinstimmung. Die Autoren empfehlen sogar die Kombination der beiden Methoden, um die mögliche MRSA-Übertragung zwischen Tieren und Klinikpersonal noch besser beurteilen zu können, da das *spa*-Typisieren eine weitergehende Diskriminierung zwischen Isolaten des gleichen Pfg-Profiles ermöglicht.

2.3.2 Bedeutung und Folgen von *S. aureus* im Bestand

Der Nachweis von *S. aureus* in einer Milchprobe in einem Milchviehbestand hat aus

unterschiedlichen Gründen Bedeutung für den Betrieb.

Durch den kontagiösen Charakter des Erregers besteht die Gefahr der Neuinfektion gesunder Viertel bzw. Kühe (s. 2.2); wegen subklinischer Mastitiden, diskontinuierlicher Ausscheidung des Erregers und Infektionen auch mit geringer zellulärer Reaktion können infizierte Viertel unerkannt bleiben; Behandlungen mit Antibiotika sowohl während der Laktation als auch zu Beginn der Trockenstehphase sind selten erfolgversprechend (s. 2.3.4.1), besonders dann, wenn es sich um chronische Infektionen handelt.

Aus diesen Gründen und dem Wissen, dass es sich bei der Mastitis um eine Faktorenerkrankung handelt, steht auch beim Nachweis von *S. aureus* nicht die Einzeltierbehandlung im Vordergrund, sondern die Bekämpfung der (subklinischen) Mastitis als Herdenproblem (DVG 2009). Zum einen erhöht die Infektion bereits eines Einzeltieres durch stärkere Keimbelastung die Infektionswahrscheinlichkeit für andere Tiere im Bestand. Zum anderen können exogene Faktoren im Betrieb den Gesundheitszustand der gesamten Herde negativ beeinflussen.

Somit stützt sich die Sanierung eines Betriebes mit *S. aureus* als Leitkeim wie auch prophylaktische Maßnahmen zum Schutz vor *S. aureus*-Infektionen (s. 2.3.3) auf mehrere Säulen (WOLTER et al. 2000, PETERSSON-WOLFE et al. 2010):

1. Effektive Maßnahmen beim Auftreten von *S. aureus*-Mastitis sind: Neuinfektionen verhindern und infektionsbegünstigende Bedingungen wie kontaminierte Melkstandböden, mehrfach benutzte Euterreinigungstücher usw. eliminieren.
2. Von entscheidender Bedeutung für die Sanierung eines Bestandes ist es, Tiere, die eine permanente Infektionsquelle darstellen, aus dem Betrieb zu entfernen. Die Auswahl der Tiere, die den Bestand verlassen müssen, erfolgt anhand verschiedener Kriterien. Tiere mit chronischen Mastitiden (d.h. auch therapieresistente Kühe), mit *S. aureus*-Infektionen in zwei oder mehr Eutervierteln, mit sich wiederholenden Phasen akuter Mastitiden, mit Vernarbungen und Fibrosen des Euterparenchyms sowie Tiere mit chronisch verringerter Milchleistung, mit mind. einer klinischen Mastitis bei erhöhtem somatischen Zellgehalt innerhalb der letzten drei Laktationsmonate sollten den Bestand verlassen (KIRK 1992, OSTERAS et al. 1999). Als therapieresistent gilt ein Tier dann, wenn es zweimal ohne Erfolg lege artis behandelt wurde oder es in der vergangenen Laktation bereits durch erhöhte Zellzahlen auffällig war und trotz antibiotischer Trockenstell-Therapie die Zellzahl in der aktuellen Laktation erhöht bleibt. Chronisch

krankte Tiere erkennt man ebenfalls an der rezidivierend erhöhten SCC der Milch, bei der Euterpalpation am knotigen Drüsenparenchym oder an mehrfachem Auftreten akuter Mastitiden (s. 2.1.2).

3. Die *S. aureus*-positiven Einzeltiere ohne Hinweis auf eine chronische *S. aureus*- Mastitis sollten nach Penicillinase-Test mit entsprechenden Antibiotika (vorzugsweise Penicillinen) intramammär und/oder parenteral behandelt werden.
4. Das Trockenstellen unter antibiotischem Schutz mit einem geeigneten Langzeitpräparat sollte bei allen laktierenden Tieren im Bestand durchgeführt werden.
5. Eine Überprüfung der Fütterung sollte durchgeführt werden, um Energie-, Vitamin-, Eiweiß- oder Spurenelementmängel auszuschließen.

Eine Maßnahme, die ebenfalls zum Schutz vor einer erhöhten Inzidenz von *S. aureus*-Infektionen im Bestand sinnvoll ist, ist die Bildung einer separaten *S. aureus*-positiven Gruppe, welche im Anschluss an die eutergesunden Kühe gemolken wird. Alle Tiere, die als *S. aureus*-positiv identifiziert werden, bilden diese Gruppe und verbleiben dort bis zum Abgang. HOEDEMAKER (2001a) stellte bei dieser Vorgehensweise eine deutliche Reduzierung der Prävalenz innerhalb von ein bis eineinhalb Jahren fest.

Neben den Folgen, die einen erhöhten Arbeitsaufwand mit sich bringen, dürfen auch die direkten finanziellen Folgen für den Landwirt nicht außer Acht gelassen werden.

Es entsteht ein wirtschaftlicher Verlust insbesondere durch die Milch-Minderproduktion aus infizierten Vierteln. Bezogen auf die Gesamtpopulation wird die Milchminderproduktion durch subklinische Mastitiden auf 5-10% geschätzt (DVG 2009). Für einen deutschen Durchschnittsbetrieb mit 35 Kühen bei einer durchschnittlichen Milchleistung von 6050kg/Kuh und Jahr und einem Milchauszahlungspreis von 30ct/l bedeutet das Einbußen von ca. 2500 - 5000 € pro Jahr.

Außerdem kommt es zu einer finanziellen Belastung durch die Kosten einer Mastitis-Therapie, die sich aus Medikamenten-, Diagnostik- und tierärztlichen Behandlungskosten zusammensetzt. Ein weiterer großer wirtschaftlicher Verlust stellt in Problembetrieben die nicht lieferbare Milch durch die Verpflichtung zur Einhaltung der Wartezeiten nach Antibiotikatherapie dar.

Die Gesamtkosten der subklinischen Mastitis in einem betroffenen Betrieb wurden pro Kuh und Jahr 1998 auf 100 bis 800 DM geschätzt (HAMANN et al. 1998).

2.3.3 Prophylaktische Maßnahmen

Auch zum Schutz vor *S. aureus*-Infektionen können die Maßnahmen zur Bestandssanierung wie im vorangegangenen Kapitel angewandt werden. In der Literatur wird mehrfach auf einen Fünf-Punkte-Plan hingewiesen (ANDERSON 1982, SMITH und HOGAN 1993, HILLERTON et al. 1995).

Dieser basiert auf:

- Zitzendesinfektion (Dippen) nach dem Melken
- Angemessene Melkhygiene
- Merzen chronisch euterkranker Tiere (s. 2.3.2)
- Trockenstellen unter antibiotischem Schutz
- Behandlung klinischer Mastitiden während der Laktation (s. 2.3.4).

Die Zitzendesinfektion nach dem Melken dient der Verhinderung von Neuinfektionen (BRAMLEY und DODD 1984). Ziel des Dippens bzw. Besprühens ist es, durch den Einsatz von desinfizierenden Wirkstoffen (z.B. mind. 3000 ppm Jod) die Zahl der Bakterien an der Öffnung des Strichkanals und der Zitzenspitze zu minimieren. Eine Reduktion der Neuinfektionsrate wurde nachgewiesen, sofern die Zitzen unmittelbar nach dem Melken mit einem entsprechenden Mittel behandelt wurden (PETERSSON-WOLFE et al. 2010).

Zu einer angemessenen Melkhygiene gehören zusätzlich zur regelmäßigen technischen Wartung der Melkanlage eine gründliche Reinigung des Euters und der Zitzen mit Einmaltüchern vor dem Melken, das Vormelken in einen dafür vorgesehenen Vormelkbecher und ein sauberes Melkgeschirr. Zusätzlich können eine Zwischendesinfektion der Melkzeuge und das Tragen von Handschuhen während des Melkens als weitere Prophylaxemaßnahmen eingesetzt werden (SEARS et al. 2003).

Das Trockenstellen unter antibiotischem Schutz dient neben der Ausheilung von bestehenden Mastitiden auch der Verhinderung von Neuinfektionen in dieser Phase. In Studien bzgl. der Wirksamkeit der Trockenstelltherapie mit Antibiotika erfolgt eine Überprüfung der Eutergesundheit bis ca. vier Wochen post partum (p.p.). Es wurden Heilungsraten von 70-90% beschrieben (KASCHE 1995, SOBIRAJ et al. 2000). Allerdings belegen diese Studien auch, dass die Art des Mastitiserregers einen starken Einfluss auf die Heilungsraten hat. In einer norwegischen Untersuchung zeigte sich, dass der Misserfolg einer Trockenstelltherapie mit Antibiotika fast viereinhalb mal wahrscheinlicher war, wenn zum Zeitpunkt des Trockenstellens eine Infektion mit major-pathogenen Keimen vorlag (OSTERAS et al. 1999).

Eine weitere mögliche Infektionsquelle ist durch den Zukauf von Tieren gegeben. Daraus ergibt sich, dass sowohl eine klinische Untersuchung dieser Zukaufstiere als auch eine bakteriologische Untersuchung einer Milchprobe als Monitoring-Maßnahme in Hinblick auf Eutergesundheit sinnvoll sind.

2.3.4 Therapiemöglichkeiten der *S. aureus*-Mastitis

Neben dem therapeutischen Einsatz zur Verkürzung der Erkrankungsdauer und der prophylaktischen Minimierung von Neuinfektionen werden Antiinfektiva auch aus Gründen des Tierschutzes und unter ethischen Gesichtspunkten eingesetzt (DVG 2009).

Zur kausalen bzw. unterstützenden Therapie von Mastitiden werden intramammär oder systemisch verschiedene Wirkstoffe eingesetzt. Neben antibakteriell wirksamen Medikamenten werden Vitamine, Sekretolytika, Vakzinen bzw. Autovakzinen, Spurenelemente, Homöopathika etc. appliziert. Auch die zur Mastitisprophylaxe vertriebenen Vakzinen werden auf diese Weise eingesetzt.

Die häufigste und bedeutendste Behandlungsmethode der *S. aureus*-Mastitis ist der Einsatz von Chemotherapeutika, wobei zwischen Laktationsbehandlung und dem Trockenstellen unter antibiotischem Schutz unterschieden werden muss (s. 2.3.4.1 und 2.3.3).

Bei der Beurteilung von möglichen Therapieerfolgen verschiedener Behandlungsmaßnahmen ist zu beachten, dass keine einheitlichen Evaluierungskriterien angewandt werden, d.h., der Begriff „Heilung“ unterliegt keiner international einheitlichen Definition, sodass bei unterschiedlichen Therapiestudien auch unterschiedliche Definitionen von „Heilung“ herangezogen werden. Damit sind die Ergebnisse verschiedener Studien untereinander nur schwer bis gar nicht vergleichbar.

KRÖMKER und HAMANN (1999) machten darauf aufmerksam, dass gesicherte wissenschaftliche Erkenntnisse zur Einordnung von Heilungserfolgen nach therapeutischen Maßnahmen nur unzureichend verfügbar sind.

Als bakteriologische Heilung bezeichnet die DVG (2009) die Eliminierung der Erreger aus dem Euter. Fraglich ist allerdings, zu welchem Zeitpunkt die Eliminierung stattgefunden hat, um von einer Heilung durch die Therapiemaßnahme sprechen zu können. In der Literatur finden sich diverse Untersuchungsprotokolle zur Feststellung des Therapieerfolges (s. Tabelle 2.5).

Unterschiede innerhalb der Studien, die einen Vergleich zusätzlich erschweren, sind unterschiedliche Untersuchungsparameter (z.B.: klinische Heilung, bakteriologische Heilung, Schalmtest bzw. Zellzahl in Zusammenhang mit zytobakteriologischen Ergebnissen der Viertelanfangsgemelke (VAG) etc.). In unterschiedlichen Studien wird der Therapieerfolg anhand folgender Parameter beurteilt: „bakteriologische Heilung“, „zytologische Heilung“ (z.B. = SCC <150.000 Zellen/ml, SCC <400.000 Zellen/ml am Tag 14 post applicationem oder Schalmtestergebnis negativ) und „vollständige Heilung“ (z.B. = SCC <500.000 Zellen/ml + euterpathogene Mikroorganismen nicht nachgewiesen oder SCC <300.000 + euterpathogene Mikroorganismen nicht nachgewiesen) (WALKENHORST 2006).

Tabelle 2.5: Untersuchungsprotokolle zur Feststellung des Therapieerfolges nach WALKENHORST (2006)

Häufigkeit der Nachuntersuchung	Tag der Beprobung nach Therapiebeginn	Beispiele aus der Literatur
einfach	3. bzw. 5.	(REINHOLD et al. 1986, TURNER 2001)
	14	(OLDHAM und DALEY 1991, FRITON et al. 1998, ÜHLINGER 1999)
	21	(GUTERBOCK et al. 1993, WINTER et al. 1997)
	30	(OSTERAS et al. 1999)
	Sechs Monate	(MEANY 1995)
doppelt	7 und 14	(TIMMS und SCHULTZ 1984)
	16 und 30	(SOL et al. 1997)
	7 und 36	(ROBERSON 2004)
mehrfach	7, 14 und 21	(KEEFE et al. 1998, DELUYKER et al. 1999)
	9 mal in 21 Tagen	(KNIGHT et al. 2000)

2.3.4.1 Chemotherapeutika zur Therapie von *S.aureus*-Mastitiden

Die allgemein als unzureichend angesehene Therapierbarkeit der *S. aureus*-Mastitis macht den Erreger zu einem Problemkeim (HOEDEMAKER 2001a). Dabei ist die Prognose von der Dauer des Bestehens der Infektion abhängig (SEARS et al. 2003).

Der Einsatz von antibakteriell wirksamen Substanzen während der Laktation ist umstritten. Die Therapieerfolge bewegen sich nach Literaturangaben im Bereich zwischen 20% und 70%

(KASCHE 1995). Andere Autoren sprechen von Heilungsergebnissen zwischen 4% und 92% (REPPEL 2006).

Diese Raten wurden bei intrazisternalen und/oder parenteralen Behandlungen erreicht, während der alleinige parenterale Therapieversuch als erfolglos beschrieben wurde (FRITON 1998). Die Kombination von intramuskulärer und intrazisternaler Applikation eines antimikrobiell wirksamen Medikamentes zeigte in einer Untersuchung von OWENS (1988) einen signifikant höheren Therapieerfolg als die alleinige intrazisternale Applikation. Diese Aussage widerlegt UEHLINGER (1999), der durch die zusätzliche intramuskuläre Applikation keinen therapeutischen Vorteil feststellen konnte.

Gegenüber der Häufigkeit von Spontanheilungen konnte kein besserer Behandlungserfolg erzielt werden (GREGORY 1999, WILSON et al. 1999).

Als Gründe für das „Versagen“ der Antibiotikatherapie werden z.B. zu niedriger Wirkstoffspiegel aufgrund der Pharmakokinetik des Medikamentes, eingeschränkte Verteilung des Medikamentes durch entzündliche Prozesse, zu kurze Behandlungsdauer, schlechter Immunstatus des Tieres, Entwicklung von Resistenzen etc. genannt (SOBIRAJ et al. 1997, FRITON 1998, SEARS et al. 2003).

In einer bundesweiten Studie zu Erregerverteilung euterpathogener Bakterien (SOBIRAJ et al. 1997) wurde durch eine *In-vitro*-Untersuchung in ca. 40% aller aus bovinen subklinischen Mastitiden isolierten *S. aureus*-Kulturen eine Penicillin G-Resistenz und eine ähnlich hohe Ampicillin-Resistenz nachgewiesen. Diese Resistenzen werden hervorgerufen durch eine β -Laktamase-Aktivität der Bakterien, die durch einen Jod-Jodkali-Stärkeagar-Test nachgewiesen werden konnte. Sensibel reagierten alle *S. aureus*-Kulturen auf Cefacetril, einem Cephalosporin. Auch Oxacillin (ein β -Laktamase-festes Penicillin) und Enrofloxacin (ein Chinolon) zeigten eine gute Wirksamkeit. Diese Ergebnisse stimmen mit einer US-amerikanischen Studie von ERSKINE et al. (2002) überein.

Vergleichbare Zahlen bzgl. Penicillin- und Ampicillin- Resistenz ergab auch eine Untersuchung in Brandenburg (KÖSTER 2005): Penicillin-Resistenz (55,3%), Ampicillin-Resistenz (56,9%). KÖSTER wies allerdings auch eine hohe Neomycin- Resistenz von 54,5% nach, die demgegenüber bei der Untersuchung von SOBIRAJ et al. (1997) nicht auftrat.

In einer anderen US-amerikanischen Untersuchung zeigten sich deutlich weniger Resistenzen bei den isolierten *S. aureus*-Kulturen. Von 357 getesteten Stämmen wurde bei nur 13% eine

Penicillin-Resistenz festgestellt, bei 3% eine Erythromycin-Resistenz und bei 0,5% eine Tetracyclin-Resistenz (ANDERSON et al. 2006).

Andererseits scheint es keine ausreichende Alternative zum Einsatz der Chemotherapeutika zu geben (DVG 2009).

Der Einsatz von in kurzen Intervallen durchgeführten Kontrollen der Eutergesundheit (Milchmenge, Temperatur, CMT und Milchflussrate) kann einen besonders frühen Hinweis auf Infektionen geben (DVG 2009). In frühen Phasen einer Mastitis ist die bakteriologische Heilungschance deutlich höher als bei bereits länger bestehenden Infektionen. Diese Kontrollen könnten zukünftig beispielsweise mittels automatisierter Detektionssysteme durchgeführt werden.

Um den Einsatz von Antibiotika auf erforderliche Indikationen zu beschränken und damit die Möglichkeit der Resistenzentwicklungen zu reduzieren, wurden die „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln“ von der Bundestierärztekammer (BTK) und der Arbeitsgruppe Tierarzneimittel (AGTAM) zusammengestellt (2010). Im Besonderen wird dazu aufgerufen, die Auswahl des Wirkstoffes unter besonderer Berücksichtigung des Einzelfalls zu treffen, z.B. nach Durchführung einer In-Vitro-Resistenztestung (BARKEMA et al. 2006).

2.3.4.2 Einsatz von Schutzimpfungen gegen *S.aureus*-Mastitiden

Schutzimpfungen werden unterschieden in aktive und passive Vakzinationen.

Aktive Vakzination bewirkt durch iatrogene, antigenspezifische Aktivierung des Immunsystems eine spezifische Immunität, die über Monate bis Jahre andauern kann. Der Erfolg einer Vakzination ist abhängig zum einen von der Qualität des Impfstoffes, aber auch von der immunologischen Aktivität des Abwehrsystems des Impflings.

Bei den aktiv immunisierenden Impfstoffen unterscheidet man z.B.:

- Lebendimpfstoffe (das immunisierende Agens ist vermehrungsfähig, aber avirulent oder schwach virulent)
- Inaktivierte Impfstoffe/ Totvakzinen/ Spaltvakzinen (das immunisierende Agens ist nicht vermehrungsfähig, oder es handelt sich um Antigenkomponenten, wie z.B. Subunits; diesen Impfstoffen sind häufig Adjuvantien bzw. Adsorbentien zugesetzt, um die immunisierende Aktivität der inaktivierten Keime zu steigern)
- Toxoidimpfstoffe (das immunisierende Agens sind entgiftete Toxine von

Mikroorganismen = Toxoide)

Bei der aktiven Vakzination kann es auch zu einer sogenannten heterologen bzw. heterotypischen Immunisierung kommen. Diese Art der Immunisierung entsteht, wenn verschiedene Erregerspezies oder Toxine immunologische Verwandtschaftsverhältnisse aufweisen. Man spricht in diesem Fall auch von Kreuzimmunität.

Die passive Vakzination, auch Serumprophylaxe oder Serumtherapie genannt, beruht darauf, schützende Antikörper, die entweder erreger- oder antigenspezifisch sind, per Kolostrum, Serum oder Sekret auf den Impfling zu übertragen.

Die Kombination von aktiver und passiver Immunisierung nennt man Simultanimpfung.

Misch- oder Mehrfachimpfstoffe beinhalten mehr als einen Erreger bzw. Zielantigen. Man unterscheidet polyvalente Impfstoffe, die aus unterschiedlichen Serotypen einer Spezies bestehen, von Kombinationsvakzinen, die aus Antigenen unterschiedlicher Erreger zusammengesetzt sind.

Der Begriff „stallspezifische Vakzine“ beschreibt einen Impfstoff, der nur für die Tiere eines Betriebes hergestellt wurde und der ausschließlich Erreger, Antigene oder Toxine, die zuvor aus diesem Bestand isoliert wurden, enthält. Eine solche Vakzine darf nur in diesem speziellen Tierbestand angewendet werden.

Autovakzinen dagegen sind Impfstoffe, die nur für ein Individuum hergestellt wurden (GEDEK et al. 1993b).

Die Vakzination gegen Mastitiserreger stellt eine besondere Herausforderung dar, denn die übliche Reaktion des Körpers auf eine Vakzine – eine Steigerung der Zahl von Abwehrzellen – soll hier eigentlich vermieden werden (ANDERSON 1982, HOFFMANN 1991, YANCEY jr. 1999). Durch die Steigerung der Immunantwort würde man somit eine unspezifische Mastitis hervorrufen. Von besonderer Bedeutung bezüglich der Immunprophylaxe von Mastitiden ist die Produktion spezifischer Antikörper.

Die Phagozytose ist der grundlegende Mechanismus der Abwehr bakterieller Infektionen der Milchdrüse (MALINOWSKI 2002). Diese Phagozytose nach Opsonisierung gehört u.a. zu den Antikörper-vermittelten Abwehrmechanismen der Milchdrüse. Außerdem steigert die Antikörper-vermittelte Immunantwort der Milchdrüse die Antiadhäsionsaktivität und führt zur

Neutralisation der bakteriellen Toxine.

Problematisch ist die Vakzinierung durch die hohe Antigenvariabilität möglicher Erreger (WIELER und BALJER 1999). Desweiteren wird die Wirksamkeit der Vakzination negativ beeinflusst durch die enorme Größe der Oberfläche des Drüsenepithels, die inhibitorische Wirkung verschiedener Milchinhaltsstoffe auf phagozytierende Zellen und die guten Wachstumsmedium, die Bakterien in Milch vorfinden (YANCEY jr. 1999).

Das Ziel einer Impfung ist abhängig vom Infektionsstatus des zu impfenden Tieres. Im Falle einer klinischen Mastitis sollte das Ziel der Impfung eine Reduzierung der Schwere der klinischen Symptomatik, eine Verkürzung der Behandlungsdauer und eine Erhöhung der Heilungsraten sein. Dieses Ziel kann beispielsweise durch eine passive Immunisierung erreicht werden. Da aber die meisten *S. aureus*-Mastitiden subklinisch verlaufen, kann das Ziel einer Impfung auch ein Verhindern der Ausbreitung innerhalb des Bestandes sein (MIDDLETON 2008).

Durch die geringen Heilungsraten nach dem Einsatz von antimikrobiell wirksamen Substanzen wurde eine Vakzinierung gegen *S. aureus* besonders intensiv erforscht. Da es sich um extrazelluläre Erreger handelt, findet die spezifische Abwehr zunächst auf der Ebene der Antikörperbildung statt.

Die Opsonisierung mit anschließender Phagozytose durch neutrophile Granulozyten steht bei den Abwehrmechanismen gegenüber *S. aureus* im Vordergrund, aber auch die Antiadhäsionsaktivität und die Neutralisation der *S. aureus*-Toxine sind wichtige Wirkprinzipien (NORDHAUG et al. 1994b). Der für die Opsonisierung wichtigste Antikörper ist der Isotyp IgG₂. Für die Neutralisation der bakteriellen Toxine und Steigerung der Antiadhäsionsaktivität spielen IgM, IgA und IgG₁₊₂ eine bedeutende Rolle.

Das einfachste Prinzip der Vakzineherstellung ist die Ganzzell-Vakzine, Ganzzell-Lysat-Vakzine oder Bakterin (= mit Zusatz von Aluminiumhydroxid oder Calciumphosphatgel). Nach einer *In-Vitro*-Kultivierung der Mastitiserreger erfolgt eine Inaktivierung oder Abtötung, ggf. werden noch Adjuvantien und/oder Toxoide hinzugefügt (NORDHAUG et al. 1994a, HOEDEMAKER et al. 2001b, MIDDLETON 2008).

Zwei kommerzielle Impfstoffe gegen *S. aureus*- Mastitiden sind momentan erhältlich - in den USA unter dem Namen „Lysigin®“ seit Mitte der 1970er Jahre und in Europa unter dem Namen

„StartVac®“ seit 2009.

Lysigin® beinhaltet 5 unterschiedliche *S. aureus*- Stämme der Polysaccharid- Serotypen 5, 8 und 336. Obwohl dieser Impfstoff seit fast 40 Jahren erforscht und eingesetzt wird, wird dessen Wirkung gegenüber intramammären *S. aureus*-Infektionen nicht einheitlich beurteilt. Verschiedene Studien zeigten, dass klinische Mastitiden milder verliefen, der SCC reduziert werden konnte und die Anzahl an Spontanheilungen zunahm. In einer Studie konnte auch die Reduktion von Neuinfektionen in zwei von drei untersuchten Herden nachgewiesen werden. In einer experimentellen Infektionsstudie mit Erstkalbinnen, in der Lysigin® mit zwei verschiedenen Bakterin-Vakzinen und einer ungeimpften Kontrollgruppe verglichen wurde, konnte jedoch zwischen den vier Gruppen kein Unterschied bzgl. der bakteriologischen Heilungsrate festgestellt werden. Die mit Lysigin® geimpften Kühe zeigten dennoch gegenüber den Kühen der anderen drei Gruppen mildere Verläufe der klinischen Mastitiden; sowohl der SCC als auch die Milchmenge war in allen vier Gruppen vergleichbar (MIDDLETON. 2008).

StartVac® wird als Vakzine gegen *S. aureus*- und *E. coli*-Mastitiden eingesetzt. Sie beinhaltet den inaktivierten *E. coli*-Stamm J5 und das Oberflächenpolysaccharid Poly-N-acetyl β -1,6 Glukosamin (PNAG) des Biofilm produzierenden *S. aureus*- Stammes SP140. PNAG ist der Hauptbestandteil des sogenannten „slime associated antigenic complex“ (SAAC). Der SAAC ist eingebettet in dem Biofilm, der bestimmte Bakterien umgibt, und besteht aus Oberflächenpolysacchariden, die mit Proteinen verbunden und in Liposomen eingebettet sind. In einer spanischen Studie (PEREZ et al. 2009) wurden verschiedene Zusammensetzungen einer Vakzine mit und ohne PNAG getestet, um die antigenen Eigenschaften des PNAG genauer zu charakterisieren:

- a) Zellfreie Vakzine mit Oberflächenpolysacchariden, gereinigt oder in Form von Zellextrakten
- b) *S. aureus* ohne Biofilm
- c) *S. aureus* mit starker Biofilm-Bildung

Als Impfstämme wurden vier *S. aureus*- Stämme mit unterschiedlichen Kapselpolysacchariden (CP) ausgewählt. Es wurden 81 gravide Schafe zweimal im Abstand von fünf Wochen geimpft. Ca. vier Tage nach dem Ablammen wurde der Versuch einer Belastungsinfektion mit einem Biofilm-produzierenden *S. aureus*-Stamm intramammär durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen bis zum Tag 9 nach dem Challenge untersucht (Milch:

zytobakteriologisch, Serum: PNAG-Ak, Klinisch: Schweregrad der Mastitiden). 16 Tiere bildeten eine ungeimpfte Kontrollgruppe. Die Gruppengröße der Impftiere in neun Gruppen variierte zwischen fünf und zehn.

Das Ergebnis zeigte, dass Tiere, bei denen PNAG-Ak im Serum nachgewiesen wurden, vor *S. aureus*-Infektionen geschützt waren.

Obwohl unterschiedliche CP-Typen als Vakzinestämme eingesetzt wurden, konnte bei Kontrolluntersuchungen nur ein PNAG-Serotyp nachgewiesen werden, sodass man davon ausgehen kann, dass PNAG-Ak vor einem breiten Spektrum an *S. aureus*-Stämmen, die zu chronischen Infektionen führen, schützen können. Die Ak wurden allerdings in geringerem Maße produziert, wenn die Tiere mit zellfreier Vakzine geimpft wurden. Die Autoren erklären dies damit, dass eine Produktion von Antikörpern dann besonders angeregt wird, wenn die antigenen Strukturen an Proteine oder an bakterielle Zellen gekoppelt sind. Bei Tieren, die mit *S. aureus*-Stämmen mit starker Biofilm-Produktion geimpft wurden, konnte der beste Impfschutz vor Mastitiden erreicht werden.

Eine weitere *S. aureus*-Vakzine aus inaktivierten, SAAC-bildenden Bakterien wurde an 12 tragenden Färsen erprobt (PRENAFETA et al. 2010). Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe wurde mit einem Bakterin geimpft, das einen geringen Anteil SAAC beinhaltete, der zweiten Gruppe wurde eine Vakzine mit einem hohen Gehalt an SAAC verabreicht, und die dritte Gruppe diente als ungeimpfte Kontrolle. Die beiden eingesetzten Vakzinen beinhalteten auch den *E. coli*- Stamm O111:B4 (J5).

Die Impfung wurde präpartal zweimal im Abstand von 35 Tagen appliziert. Nach dem Abkalben wurde die Belastbarkeit der Immunität durch intramammäre Injektion eines virulenten *S. aureus*-Stammes getestet. Die Tiere wurden während der Studie klinisch untersucht. Milch- und Blutproben wurden serologisch auf das Vorhandensein der SAAC-Ak getestet. Eine zytobakteriologische Untersuchung der Milchproben erfolgte ebenfalls.

Die Ergebnisse bestätigten die der Untersuchung von PEREZ et al. (2009). Bei Kühen der zweiten Gruppe wurden die meisten SAAC-spezifischen Ak nachgewiesen, die Keimzahl in der Milch dieser Tiere war nach der Belastungsinfektion im Vergleich zu den Gruppen 1 und 3 am niedrigsten. Trotzdem konnte die Impfung *S. aureus*-Infektionen nach der Belastung mit dem virulenten *S. aureus*- Stamm nicht verhindern. Die Unterschiede der klinischen Parameter zwischen den drei Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Allerdings weisen die Autoren

darauf hin, dass die durchgeführte Belastungsinfektion nicht direkt mit den natürlichen Mechanismen einer Infektion verglichen werden kann. Um die tatsächliche Effizienz der Vakzine festzustellen, empfehlen sie die Durchführung von Feldstudien.

Da die Diversität der *S. aureus*- Stämme innerhalb eines Betriebes relativ gering ist (SOMMERHÄUSER et al. 2003, EISSA 2007), wurde auch der Einsatz von stallspezifischen Vakzinen getestet.

HOEDEMAKER et al. (2001b) stellten aus dem isolierten *S. aureus*-Stamm einer älteren, chronisch Mastitis-kranken Kuh eines Betriebes, bei der gelegentlich klinische Mastitiden zu beobachten waren, eine stallspezifische Bakterin-Vakzine her und impften damit 35 Tiere. Eine Kontrollgruppe, die mit einem Placebo (Zusammensetzung wie die Vakzine, aber ohne Bakterien) geimpft wurden, bestand aus 36 Tieren. Die Vakzine wurde jeweils nahe dem Euterlymphknoten appliziert. Der Bestand war chronisch mit *S. aureus* infiziert (Herdenprävalenz 20-30%). Viertelgemelksproben wurden monatlich zytobakteriologisch untersucht. Außerdem wurden Blutproben der Tiere auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *S. aureus* mittels ELISA untersucht. Der Betrieb wurde insgesamt ca. 30 Monate beobachtet.

Die Inzidenz der klinischen, subklinischen und latenten *S. aureus*-Infektionen unterschied sich nach der Impfperiode nicht signifikant zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Bzgl. der untersuchten Färsen ergab sich sogar auf Euterviertelebene im Vergleich zu der Placebogruppe eine erhöhte Inzidenz subklinischer Mastitiden bei den geimpften Tieren. Die Antikörpertiter im Blutserum lagen gegenüber der ungeimpften Kontrollgruppe höher. Diese Ergebnisse entsprechen denen von NORDHAUG et al. (1994a) und EDINGER (2001).

GIRAUDO et al. (1997) testeten eine Impfung, die aus *S. aureus*-Exopolysacchariden und abgetöteten *S. aureus*- (mit und ohne Kapsel) bzw. *Streptococcus spp.*-Stämmen hergestellt wurde. Eine Placebo-Gruppe wurde mit einer „Vakzine“ ohne Bakterien- bzw. Exopolysaccharid-Zusatz behandelt. Die Impfung/Placebo wurde bei 30 Färsen intramuskulär in den *Musculus brachiocephalicus* appliziert. Die Färsen hatten bis ca. 10 Tage vor dem Abkalben keinen Kontakt zu laktierenden Kühen. Jeweils 10 Tiere bildeten eine Gruppe. Gruppe 1 und Gruppe 3 wurden zweimal im Abstand von vier Wochen präpartal mit der Vakzine bzw. einem Placebo geimpft, und Gruppe 2 wurde postpartal zweimal im Abstand von vier Wochen mit der

Vakzine geimpft.

Das Ergebnis der Untersuchung zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der klinischen und subklinischen *S. aureus*-Mastitisrate in Gruppe 1 und 2 verglichen mit Gruppe 3. Gruppe 1 hatte eine Häufigkeit von 4,1%, Gruppe 2 2,5% und Gruppe 3 10,2%. Das Risiko einer *S. aureus*-IMI konnte somit in den Gruppen 1 und 2 um 64% bzw. 68% verringert werden.

Eine identische Vakzine inkl. Placebo wurde in einer weiteren Feldstudie in zwei argentinischen Herden getestet (CALZOLARI et al. 1997). Die Herden wurden zu Beginn der Studie auf die *S. aureus*-Prävalenz untersucht. In Herde 1 wurde in 16% der Euterviertel *S. aureus* nachgewiesen, in Herde 2 in 15%. Geimpft wurden Tiere, die sich in der Laktation befanden. Die Rate der IMI (klinisch, subklinisch und latent) durch *S. aureus* konnte in beiden Herden durchschnittlich von 11,2% auf 6,2% gesenkt werden. Allerdings traten trotz des Einsatzes der Vakzine weiterhin Neuinfektionen auf, sofern nicht ein Mindestmaß an begleitenden Hygienemaßnahmen angewendet wurde (s. 2.3.3.).

3 Tiere, Material und Methoden

Die hier präsentierten Daten einschließlich der *S. aureus*-Isolate wurden in der Zeit von September 2007 bis November 2008 von einem südosthessischen Milchviehbetrieb gesammelt. Der Betrieb wird bis über den Abschluss dieser Arbeit hinaus weiterhin regelmäßig von spezialisierten Tierärzten des Regierungspräsidiums Gießen aus dem Dezernat „Qualitätssicherung für Öko-, pflanzliche Produkte und Milch“ (im Folgenden „Milchtierärzte“ genannt) in Zusammenarbeit mit Tierärzten des Eutergesundheitsdienstes Hessen (LHL) betreut. Der Betrieb ist dem HVL (Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V.) angeschlossen.

3.1 Versuchsbetrieb

Zu Beginn der Untersuchungsphase im September 2007 waren in dem Betrieb 102 Kühe in Laktation. 13 Tiere standen zu diesem Zeitpunkt trocken. Der überwiegende Teil der Tiere des Bestands gehört zur Rasse der schwarzbunte Holstein-Friesian (enthornt), bei einem deutlich geringeren Anteil handelt es sich um BrownSwiss bzw. rotbunte Holstein-Friesian. Der Bestand wurde v.a. durch Zukauf, in geringerem Maße auch durch die eigene Nachzucht remontiert. Es wurde eine Vergrößerung der Herde angestrebt.

Die durchschnittliche Milchleistung des Betriebes lag im Jahr 2007 bei 9200kg.

Die Tiere wurden in zwei Gruppen gehalten. Ihre Aufteilung erfolgte nach dem Status der Eutergesundheit. Tiere der ersten Gruppe waren momentan „eutergesund“. Bei Tieren der zweiten Gruppe war eine *S. aureus*-Mastitis festgestellt worden. Wurde ein Tier aus Gruppe 2 mehrfach negativ auf eine *S. aureus*-Mastitis untersucht, wurde es wieder in Gruppe 1 aufgenommen. Während der Melkzeiten wurde die *S. aureus*-negative Gruppe stets als erste gemolken.

Die Tiere wurden in einem Laufstall mit Spaltenboden gehalten. Die Hochboxen waren mit Sägespänen-Kalk-Gemisch eingestreut.

Gemolken wurde im 2x3 Tandem Melkstand mit Westfalia-Melkzeug inkl. Abnahmeautomatik. Während des Untersuchungszeitraums erfolgte eine Umstellung auf Happel-Melkzeug. Nach dem Vormelken in einen Vormelkbecher wurden die Euter mittels eines schleuderfeuchten Tuchs gereinigt. Das Dippmittel nach dem Melken wurde während des Untersuchungszeitraums

mehrfach gewechselt. Es handelte sich aber stets um ein von der DVG zugelassenes jodhaltiges Mittel, das mittels eines Bechers mit Rücklaufsperrung appliziert wurde.

Die Behandlung einer akuten *S. aureus*-Mastitis wurde mit einer Kombination aus dreimaliger lokaler Applikation von Oxacillin (intrazisternal, 1000 mg/Injektion) und zweimaliger systemischer Applikation von Tylosin (parenteral, 10mg/kg) durchgeführt. Mastitiden, verursacht durch äskulin-positive Streptokokken, wurden lokal mittels dreimaliger intrazisternaler Procain-Penicillin®-Applikation (3 Mio. internationale Einheiten, i.E./Injektion) und systemisch mittels Penethamat-Hydrojodid (Ingel-Mamyzin®; 1x 10 Mio. i.E.; 2x 5 Mio. i.E.) therapiert. Der Abstand zwischen den Applikationen betrug je 24 Stunden. Bei Mastitiden durch koagulase-negative Staphylokokken wurde Albiotic intramammär® (Lincomycin 330mg, Neomycin 100mg; 3x ein Injektor/betroffenem Viertel im Abstand von 12 Stunden) eingesetzt. Das Trockenstellen unter antibiotischem Schutz erfolgte bei allen Tieren pauschal. Es wurde hierfür Orbenin® (Cloxacillin) verwendet.

3.1.1 Aktueller Status der Eutergesundheit und Klinik im Bestand

Die erste Gesamtbestandsuntersuchung zur Feststellung des aktuellen Status der Eutergesundheit durch die Entnahme von Viertelanfangsgemelkproben wurde Anfang September 2007 durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war der Bestand bereits in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 bestand aus 63 Tieren, von denen bei acht (10 Euterviertel) *S. aureus* aus dem VAG isoliert wurde. In Gruppe 2 wurden 39 Tiere beprobt, von denen bei 23 Tieren (40 Euterviertel) *S. aureus* isoliert wurde. Tiere, bei denen kurze Zeit vor der Probenentnahme eine Mastistherapie durchgeführt wurde, wurden nicht beprobt. Klinische Anzeichen einer Mastitis waren durch Flockenbildung in der Gruppe 2 nur bei einer Kuh zu beobachten.

Die Prävalenz der *S. aureus*- Infektionen betrug zu Beginn des Untersuchungszeitraums bezogen auf die 102 untersuchten Tiere 0,3. Auf Euterviertelebene betrug die Prävalenz 0,12.

3.1.2 Historie bisher erfolgter Bestandssanierung

Bei dem Bestand handelt es sich um ein Familienunternehmen. Zu Beginn der Untersuchungen arbeiteten drei Generationen auf dem Hof. Als Melker waren vorrangig zwei Personen im Einsatz. Eine Person verwendet regelmäßig Einmalhandschuhe zum Melken. Bereits seit Ende der 90er Jahre ist der Betrieb dem LLH (Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen) und den „Milchtierärzten“ des RP Gießens bzw. dem Eutergesundheitsdienst Hessen als *S. aureus*-positiv

bekannt. Seit dieser Zeit wurden immer wieder Sanierungsversuche gestartet, die allerdings langfristig nicht erfolgreich abgeschlossen werden konnten, da die Sanierungsempfehlungen nicht ganz konsequent umgesetzt worden sind. Im Frühjahr 2007 kam es zu einem deutlichen Anstieg der *S. aureus*-Mastitisrate. Es zeigte sich, dass der Betrieb seit Jahresbeginn ein Zitzenpflegemittel statt eines Zitzendesinfektionsmittels zum Dippen einsetzte. Nach dem vermehrten Auftreten von *S. aureus*-Mastitiden wurde in Zusammenarbeit mit dem LLH und den „Milchtierärzten“ die Einteilung in die zwei genannten Gruppen vorgenommen (s. 3.1).

3.2 Erarbeitung eines Sanierungskonzeptes im Versuchsbetrieb

Um eine langfristig erfolgreiche Sanierung des Betriebes erreichen zu können, wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Sanierungskonzept in Zusammenarbeit mit den Landwirten und den Milchhygienetierärzten des Regierungspräsidiums Gießen erstellt.

Grundlage dieses Konzeptes war ein Fünf-Punkte-Plan in Anlehnung an ANDERSON (1982), SMITH und HOGAN (1993) und HILLERTON et al. (1995). Der Plan beinhaltete die Zitzendesinfektion (Dippen) nach dem Melken mit einem vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) gelisteten Zitzendesinfektionsmittel, eine angemessene Melkhygiene, das Merzen chronisch kranker Tiere, eine antibiotische Therapie zum Trockenstellen mit einem Cloxacillin-Präparat (nach dem Nachweis von Penicillinase-positiven *S. aureus*-Stämmen im Betrieb) und die Behandlung klinischer Mastitiden in der Laktation mit Antibiotika. Zusätzlich wurden die bereits gebildeten Gruppen beibehalten sowohl Gesamtbestandsuntersuchungen von VAG gemäß den DVG-Leitlinien im Abstand von ca. drei Monaten als auch Untersuchungen von VAG unmittelbar nach dem Abkalben durchgeführt. Letztgenannte Maßnahme war bzgl. der Einteilung von Färsen in die beiden Gruppen von besonderer Bedeutung, da der *S. aureus*-Status der Färsen bis dahin nicht bekannt war.

Tiere mit klinischen Mastitiden und dem Nachweis von *S. aureus* wurden nach Penicillinase-Nachweis mit einer Kombination aus Oxacillin (lokal) und Tylosin (systemisch; s. 3.1) antibiotisch behandelt. Des Weiteren wurden epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von *S. aureus* innerhalb des Betriebes anhand von bakteriologischen Proben aus der Tierumgebung durchgeführt.

3.2.1 Entfernung therapieresistenter Tiere

Wurde bei einer VAG- Untersuchung eines Tieres erstmalig *S. aureus* nachgewiesen, wurde das Tier zunächst umgehend in die Gruppe der *S. aureus*-positiven Tiere aufgenommen. Danach erfolgte eine Behandlung mit Antibiotika (s. 3.1). Sofern die Therapie nicht zu einer Erregereliminierung führte, wurde das Tier in dieser Gruppe weiter gemolken, aber nicht mehr besamt und schied schließlich mit nachlassender Milchleistung aus. Ebenso wurde mit den chronisch euterkranken Tieren verfahren, sodass die Zahl der Tiere in der positiven Gruppe abnehmend war.

3.3 Entnahme der Viertelgemelksproben

Die Entnahme der Milchproben erfolgte aus dem Viertelanfangsgemelk (VAG) unter antiseptischen Bedingungen (DVG 2009). Zitzenkuppe, Zitze und Euterbasis wurden nach dem Vormelken mit schleuderfeuchten Tüchern gereinigt. Die Desinfektion insbesondere der Zitzenkuppe wurde mit in 98%igem Ethanol getränkten Einmaltüchern durchgeführt. Die ersten 3-4 ermolkene Milchstrahlen nach der Desinfektion wurden verworfen. Danach begann die antiseptische Probenentnahme von ca. 10ml Milch in sterile, verschließbare Probenröhrchen, in denen als Konservierungsmittel 1,5ml Borsäure enthalten waren.

Die Milchproben wurden in einem gekühlten Behälter spätestens 24h nach ihrer Entnahme im Labor abgegeben und zur zytobakteriologischen Untersuchung weiterbearbeitet.

3.4 Entnahme von Umweltproben

Eine bakteriologische Untersuchung der Tierumgebung (Melkstand, Stall, Personal) wurde anhand von Tupferproben bzw. dem direkten und indirekten Ausstrich von verschiedenen Materialien durchgeführt. Nach Entnahme wurden die Tupfer umgehend in ein Agargel gegeben. Tupferproben wurden von folgenden Oberflächen genommen (Gesamtanzahl der gesammelten Proben während des Beobachtungszeitraumes):

1) Tierumgebung:

Melkstandboden (10), Melkzeug (7), Vormelkbecher (2), Dippbecher (1), frisches Eutertuch (5), Staub (5), Fliegen (5)

2) Tupferproben von Tier bzw. Mensch:

Strichkanal/Zitzenhaut/Euterhaut von als *S.aureus*-negativ eingestuften Tieren (2/2/2),
Strichkanal/Zitzenhaut/Euterhaut von als *S.aureus*-positiv eingestuften Tieren (3/3/8),
Abszesse bzw. Hautläsionen der Tiere (6), Hände bzw. Handschuhe und Nasensekret der
Melker (4/4)

Diese Proben wurden, wie auch die VAG-Proben, innerhalb von 24h im Labor angeliefert und dort bakteriologisch untersucht.

3.5 Zytobakteriologische Untersuchung der Viertelgemelksproben

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Zellzahl der angelieferten VAG mittels fluoreszenzoptischer Methode (Fossomatic 360, Foss Electric, Dänemark; IDF 1995) bestimmt. Die kulturell- bakteriologische Untersuchung aller Milchproben erfolgte nach Ausstreichen der Milch mittels sterilen Glasstabs auf Columbia-Agar mit 5% Rinderblut und 0,1% Äskulin nach den Vorgaben der DVG (2009). Die vier Proben eines Tieres wurden durch Vierteilung der Platte auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Bebrütung bis zur Erstablesung erfolgte bei 37°C unter aeroben Bedingungen für 18-24h. Die Zweitablesung fand nach weiteren 18-24h Bebrütung unter identischen Bedingungen statt.

Die Beurteilung des Keimwachstums erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. kulturell kein Wachstum
2. 1-3 morphologisch unterschiedliche Keime (s.u.)
3. >3 morphologisch unterschiedliche Keime (= Kontamination)

Eine quantitative Bewertung der gewachsenen Kolonien fand nach folgenden Kriterien statt:

- + (geringes Wachstum): < 6 gleichartige Kolonien
- ++ (mittelgradiges Wachstum): 6-15 gleichartige Kolonien
- +++ (hochgradiges Wachstum): >15 gleichartige Kolonien.

Die Identifizierung der unterschiedlichen Keime wurde anhand der von der DVG genannten „Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern“ durchgeführt (2009).

Mikroorganismen mit einer Koloniegröße von <1mm, die weiß, punktförmig-flach und matt-glänzend auf Blut-Agar wuchsen, wurden als *Corynebacterium sp.* angesprochen.

Als Streptokokken wurden Kolonien identifiziert, die kleine, durchscheinende Kolonien bildeten. Zur Differenzierung der Streptokokken wurden der Äskulinabbau, die Zugehörigkeit zu einer Lancefield-Gruppe anhand der Objektträgeragglutination, der CAMP-Test und die

Hämolyseformen beurteilt.

Äskulin-negativ: *S. dysgalactiae* (α -Hämolyse, Lancefield-Gruppe C), *S. agalactiae* (anhämolysierend, α - oder β -Hämolyse, CAMP-Test positiv)

Äskulin-positiv: *S. uberis* (anhämolysierend), Enterokokken (anhämolysierend, Lancefield-Gruppe D)

Stecknadelspitz-große, durchsichtige Kolonien, die auf Blutagar nach 48 h mit vollständiger Hämolyse wuchsen und im CAMP-Test mit *S. aureus* negativ reagierten, wurden als *Arcanobacterium pyogenes* identifiziert.

Mikroorganismen mit einer Koloniegröße von ca. 1-3mm, die flach, trocken bis glänzend, weiß oder cremefarben bis goldgelb auf Blut-Agar wuchsen, wurden als *Staphylococcus spp.* oder Hefen (Identifizierung im Nativpräparat als rundlich-ovale Zellen mit teilweiser darstellbarer Sprossung, typischer Hefegeruch, Wachstum auf SABOURAUD-Agar) angesprochen.

Um in unsicheren Fällen Streptokokken von Staphylokokken sicher abgrenzen zu können, wurde in Einzelfällen ein Objektträger-Test mit Wasserstoffperoxid-Lösung auf Katalasebildung durchgeführt. *Streptococcus spp.* bildet keine Katalase und reagiert dementsprechend negativ (= keine Bläschenbildung).

Die Differenzierung der Staphylokokken erfolgte anhand der Koagulase-Reaktion in Koagulase-negative und Koagulase-positive Keime. *S. aureus* zeigt eine positive Koagulase-Reaktion und meist eine Hämolyse (α - und/oder β -Hämolyse). In Fällen, in denen eine Reinkultur anhämolysierender Staphylokokken in Zusammenhang mit einer deutlich erhöhten Zellzahl der Milch (>1 Mio. Zellen/ml) gefunden wurde, wurde ebenfalls ein Koagulase-Test durchgeführt, um nicht-hämolysierende *S. aureus*-Stämme zu identifizieren. Weitere Untersuchungen zur *S. aureus*-Identifizierung sind in den Abschnitten 3.9 und 3.10 beschrieben. Die Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) wurden nicht weitergehend differenziert.

Mikroorganismen mit einer Koloniegröße von 2-4mm, die gewölbt und glänzend-schleimig wuchsen, wurden als coliforme Keime angesprochen. Das Wachstum auf GASSNER-Agar (Oxoid) diente als Bestätigung und zur Unterscheidung der Keime bzgl. des Laktoseabbaus (Laktose positiv: *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*; Laktose negativ: *Proteus spp.*, *Serratia spp.*). Eine weitere Differenzierung war durch den Oxidase-Test (Teststreifen von Oxoid) möglich (Pseudomonaden: Oxidase positiv = blau; *E.coli*: Oxidase negativ = farblos). War rötliches Wachstum auf Blut-Agar, gelbliches Wachstum auf GASSNER-Agar und ein negativer Indol-Test

zu beobachten, wurden die Kolonien als *Serratia spp.* angesprochen. *Proteus spp.* wurde durch charakteristisches schwärmendes Wachstum u.a. auf GASSNER-Agar identifiziert.

3.5.1 Vergleich unterschiedlicher Ausstrichverfahren

Bei der fünften Gesamtbestandsuntersuchung im August 2008 wurden 100 VAG in drei unterschiedlichen Ausstrichverfahren untersucht, um festzustellen, ob durch ein bestimmtes Ausstrichverfahren die Nachweisrate von *S. aureus* im Vergleich zu der konventionellen Methode (DVG 2009) erhöht werden kann.

Methode A: konventionelle Methode laut DVG (2009), s. 3.5

Methode B: 100 µl Milch mittels Glasspatel auf Blut-Agar ausstreichen

Methode C: 1 ml Milch auf Blut-Agar mittels Schwenken der Platte verteilen und anschließend Platte ausklopfen

Die Bebrütung und Ablesung erfolgte bei allen drei Methoden unter den gleichen Bedingungen (s. 3.5).

Die Milch stammte von 15 Tieren. Fünf Tiere wurden mittels Einzelproben und zehn Tiere, aus deren Milch in der letzten Gesamtbestandsuntersuchung *S. aureus* isoliert worden war, wurden mittels Doppelproben untersucht.

3.6 Bakteriologische Untersuchung der Umweltproben

Die Tupferproben aus der Umwelt wurden auf Columbia-Agar (Oxoid) mit 5% Rinderblut und 0,1% Äskulin ausgestrichen. Dazu wurde der Tupfer zuerst an einem Rand der Agarplatte direkt ausgestrichen und dann das Material mit steriler Öse durch einen Dreifachausstrich auf der gesamten Platte verteilt.

Danach wurde der Tupfer in ein 9ml-Röhrchen Serumbouillon gegeben, um eine Anreicherung bestimmter Keime bei geringer Keimzahl zu erreichen.

Die Agarplatten der Umweltproben wurden nach den gleichen Vorgaben bebrütet und abgelesen wie die VAG-Proben (s. 3.3).

Nach 18-24-stündiger aerober Bebrütung der Tupfer in der Serumbouillon bei 37°C wurde mittels steriler Öse eine Probe entnommen und wie beschrieben ausgestrichen, bebrütet und abgelesen.

3.7 Konservierung der *S. aureus*-Isolate

Um die Isolate bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung zu lagern, wurden ca. 10-20 Kolonien einer Reinkultur in 1 ml Rinderserum mit 6% Glukose suspendiert. Das Einfrieren erfolgte in 2 ml Eppendorf-Gefäßen.

Zur weiteren Bearbeitung wurde die Suspension bei Raumtemperatur aufgetaut, mit einer sterilen Öse auf Rinderblutagar ausgestrichen und bei 37°C für 18- 24h bebrütet.

3.8 Auswahl weiterer in Hessen isolierter boviner *S. aureus*-Stämme

Zusätzlich zu den *S. aureus*- Isolaten aus dem südhessischen Betrieb wurden weitere 92 Isolate aus ganz Hessen nach phänotypischer (s. 3.9.1) und genotypischer (s. 3.10.1.5) Identifizierung mittels *spa*-Typisierung untersucht. Diese Isolate wurden vom Eutergesundheitsdienst im Rahmen von Betriebskontrollen anhand von VAG-Proben aus *S. aureus*-Problembetrieben asserviert.

Die Auswahl dieser Isolate erfolgte anhand folgender Kriterien:

- Isolat lag in Reinkultur vor
- SCC des betroffenen Viertels: > 1Mio. Zellen/ml VAG
- ein Isolat pro Betrieb
- ein Isolat pro Ortschaft
- möglichst breite, randomisierte Verteilung innerhalb des hessischen Landesgebietes

Danach ergab sich die in Abb. 3.1 dargestellte Verteilung in Hessen.

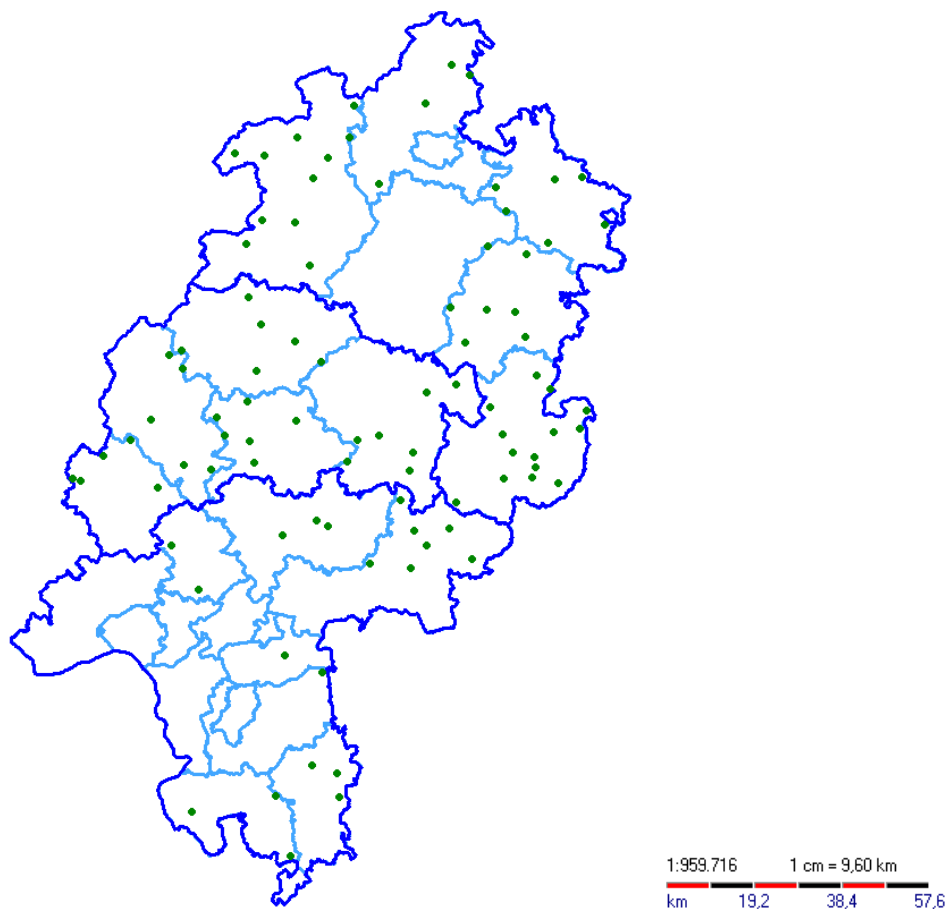


Abbildung 3.1: Verteilung der hessischen bovinen *S. aureus*-Isolate

3.9 Phänotypische Identifizierung von *S. aureus*

3.9.1 Wachstum auf Blutagar

Die Identifizierung der *S. aureus*-Kolonien erfolgte zum einen durch die makroskopische Beurteilung der Koloniegröße, -form und -farbe, zum anderen durch die Hämolyseformen. War keine Hämolyse sichtbar, wurde eine Koagulasereaktion (s. 3.9.2) durchgeführt, um anhämolysierende Stämme dennoch als *S. aureus* zu identifizieren.

Die Hämolyseformen wurden nach 48h bei 37°C unter aeroben Bedingungen beurteilt. In einer Gesamtbestandsuntersuchung wurde ein Teil der VAG (Proben der *S. aureus*-positiven Gruppe) gleichzeitig auf Schaf- und Rinderblutplatten (beide Oxoid) ausgestrichen, um die Ausprägung der Hämolyse in Abhängigkeit der vorhandenen Erythrozyten beurteilen zu können.

Um Penicillinresistenzen zu erkennen, wurde mit den *S. aureus*-Isolaten außerdem ein Penicillinase-Test durchgeführt.

3.9.2 Nachweis der Plasma-Koagulase

Die Koagulase wurde nachgewiesen mittels Röhrchentest nach KLOOS (1980). Dazu wurden 250µl Kaninchenplasma mit 3 ml A. dest. und 8 ml (0,15mol/l) NaCl versetzt und in 0,3ml-Aliquoten in sterile Glasröhrchen pipettiert.

In jedes Aliquot wurden 3-5 Kolonien der fraglichen Bakterienkultur gegeben. Nach einer aeroben Bebrütung für 24h bei 37°C erfolgte die Beurteilung der Koagulation. Eine positive Reaktion lag dann vor, wenn ein zusammenhängendes Koagulum im Röhrchen zu erkennen war.

Bei jedem Testansatz wurde als positive Kontrolle der *S. aureus* ATCC-Stamm 25923 und als negative Kontrolle der *S. epidermidis* ATCC-Stamm 14990 mitgeführt.

3.9.3 Untersuchung mittels VITEK2

Sofern die Koagulasereaktion positiv verlief, wurde zur weiteren biochemischen Bestätigung eine Untersuchung mittels VITEK 2 compact (Biomérieux) durchgeführt. Sofern es sich bei den Isolaten um Stämme derselben Kuh des identischen Entnahmedatums handelte, wurde nur eines der Isolate im VITEK2 getestet.

Dazu wurde von einer auf Columbia-Agar in Reinkultur gewachsenen Bakterienkultur eine Suspension in 5ml steriler Infusionslösung (AirlifeTM 0,45%, SodiumCl, Cardinal Health) mit einer Dichte von ca. 0,7 (Vitek Densicheck, Biomérieux) hergestellt. Diese Suspension wurde mit einer für grampositive Bakterien bestimmten biochemischen Reaktionskassette verbunden und in das Gerät gestellt. Das Röhrchen mit der Bakteriensuspension wurde nach ca. 3min wieder aus dem Gerät entnommen. Zur Absicherung der Reinkultur wurde die Bakteriensuspension auf Columbia-Agar und Gassner-Agar als sogenannte „Mediumkontrolle“ ausgestrichen. Sofern auf den Agarplatten der Mediumkontrolle eine Reinkultur nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C gewachsen war, konnten die biochemischen Ergebnisse des VITEK 2 compact gewertet werden.

3.10 Genotypische Identifizierung des *S. aureus*

3.10.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.10.1.1 DNA-Präparation

Die Präparation der bakteriellen DNA erfolgte nach einer von FRÉNAY et al. (1996) beschriebenen Methode.

Dabei wurden in einem Probenröhrchen mit Schraubverschluss (0,5ml) 50µl TE-Puffer vorgelegt und 4-6 Kolonien der reinen Subkultur von einer Blutagarplatte mittels steriler Öse in das Gefäß überführt. Nach Zusatz von 2,5µl Lysostaphin (Sigma) und Vortexen wurde die Bakteriensuspension bei 37°C für 1h inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 2,5µl Proteinase K (Qiagen) erfolgte die Entproteinisierung über 2h bei 56°C.

Die Inaktivierung der Proteinase K wurde durch 10-minütige Inkubation bei 100°C erreicht. Die Proben wurden sofort im Tiefkühlschrank (-20°C) gelagert.

Vor dem Einsatz in die PCR wurden die Proben nach dem Auftauen 3-5min zentrifugiert (14.000xg), so dass der Überstand als „Template“ verwendet werden konnte.

3.10.1.2 Durchführung der PCR

Die PCR wurde mit der Erstellung eines „Mastermixes“ begonnen. Entsprechend der Anzahl der in einer PCR untersuchten Stämme plus Negativ- und Positivkontrolle wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Aqua dest.	14,0 µl (14,4 µl bei Protein-A-Gen-Xr/IgG-bindende Region-PCR)
Puffer m. MgCl ₂ (10x)	2,0 µl
dNTP-Mix (10mmol/µl)	0,4 µl
Primer forward (10pmol/µl)	0,7 µl (0,5 µl bei Protein-A-Gen-Xr/IgG-bindende Region-PCR)
Primer reverse (10pmol/µl)	0,7 µl (0,5 µl bei Protein-A-Gen-Xr/IgG-bindende Region-PCR)
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl

Je 18µl des Mastermixes wurden in ein 200µl Reaktionsgefäß überführt und mit 2µl der nach

3.10.1.1 präparierten DNA vermischt. Vor dem Einsatz in den Thermocycler (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) wurden die Gefäße mittels Tischzentrifuge zentrifugiert, sodass keine Bläschen in dem Reaktionsgefäß vorhanden waren.

Nach dem Ende des Temperaturprogramms, das bei den vier durchgeführten PCRen leicht variierte (s. dort), wurden die Proben bei 4°C bis zum Einsetzen in die Elektrophorese im Kühlschrank aufbewahrt.

3.10.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur horizontalen, elektrophoretischen Auftrennung wurde ein 1,5-2%iges Agarosegel (Biozym) genutzt. In die vorgegebenen Slots wurden 8µl des PCR-Produktes, das zuvor mit 2,5 µl Probenauftragspuffer versetzt wurde, pipettiert. Als DNA-Längenstandard wurden 4µl des Markers pBR328 oder puc19 (beide CarlRothGmbH) in Slot eins aufgetragen. Als Laufpuffer diente ein 1xTBE-Puffer, der auch zur Herstellung des Agarosegels eingesetzt wurde. Die Laufbedingungen richteten sich nach der Größe des Agarosegels. Große Gele (15x15cm) liefen bei 120V 75min, kleine Gele (7x10cm) bei 100V 55min.

3.10.1.4 Ethidiumbromidfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Amplifikate erfolgte die Färbung des Agarosegels mittels wässriger Ethidiumbromid-Lösung (5 U/µl, Merck) für 20 min. Dabei lagert sich das Ethidiumbromid in die Doppelstränge der DNA ein. Nach der Färbung erfolgte das Entfärben der unspezifischen Ethidiumbromid-Bindungen mittels A. dest. Die gefärbten Agarosegele wurden mit dem System „GelDoc1000“ (BioRad) unter UV-Licht ausgewertet und dokumentiert.

3.10.1.5 Untersuchung auf das Thermonuklease-Gen (*nuc*)

Die Primer, die zur Amplifikation des Thermonuklease-Gens in das Mastermix (s. 3.10.1.2) eingesetzt wurden, hatten die folgende Gensequenz (BRAKSTADT et al. 1992):

Primer forward: gCg ATT gAT ggT gAT ACg gT

Primer reverse: AgC CAA gCC TTC ACg AAC TAA AgC

Nach Einsetzen der Proben in den Cycler wurde das folgende Temperaturprogramm gestartet:

1x	95°C	3min	initiale Denaturierung
30x	95°C	30sec	Denaturierung
	58°C	30sec	Annealing

	72°C	60sec	Elongation
1x	72°C	5min	Renaturierung

Das Amplikon, das nach der PCR durch die Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht wurde, hatte eine Größe von 279 bp.

3.10.1.6 Untersuchung auf das Koagulasegen (*coa*)

Die Primer, die zur Amplifikation des Koagulase-Gens in das Mastermix (s. 3.10.1.2) eingesetzt wurden, hatten die folgende Gensequenz (HOOKEY et al. 1998):

Primer forward: ATA gAg ATg CTg gTA CAg g

Primer reverse: gCT TCC gAT TgT TCg ATg C

Nach Einsetzen der Proben in den Cycler wurde das folgende Temperaturprogramm gestartet:

1x	95°C	3min	initiale Denaturierung
30x	95°C	30sec	Denaturierung
	58°C	30sec	Annealing
	72°C	60sec	Elongation
1x	72°C	5min	Renaturierung

Das Amplikon, das nach der PCR durch die Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht wurde, hatte eine variable Größe von 500 bis 970 bp.

3.10.1.7 Untersuchung auf das Protein-A-Gen (IgG-bindende Region)

Die Primer, die zur Amplifikation der IgG-bindenden Region des Protein-A-Gens in das Mastermix (s. 3.10.1.2) eingesetzt wurden, hatten die folgende Gensequenz (SEKI et al. 1998):

Primer forward (*spal*): CAC CTg CTg CAA ATg CTg Cg

Primer reverse (*spall*): ggC TTg TTg TTg TCT TCC TC

Nach Einsetzen der Proben in den Cycler wurde das folgende Temperaturprogramm gestartet:

1x	95°C	3min	initiale Denaturierung
30x	95°C	30sec	Denaturierung
	58°C	30sec	Annealing
	72°C	60sec	Elongation
1x	72°C	5min	Renaturierung

Das Amplikon, das nach der PCR durch die Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht wurde, hatte eine variable Größe von 380 bis 920 bp.

3.10.1.8 Untersuchung auf das Protein-A-Gen (Xr-Region)

Die Primer, die zur Amplifikation der Xr-Region des Protein-A-Gens in das Mastermix (s. 3.10.1.2) eingesetzt wurden, hatten die folgende Gensequenz (FRÉNAY et al. 1996):

Primer forward (*spaIII*): CAA gCA CCA AAA gAg gAA

Primer reverse (*spaIV*): CAC CAg gTT TAA CgA CAT

Nach Einsetzen der Proben in den Cycler wurde das folgende Temperaturprogramm gestartet:

1x	95°C	3min	initiale Denaturierung
30x	95°C	30sec	Denaturierung
	58°C	30sec	Annealing
	72°C	60sec	Elongation
1x	72°C	5min	Renaturierung

Das Amplikon, das nach der PCR durch die Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht wurde, hatte eine variable Größe von 100 bis 350 bp.

3.10.1.9 Untersuchung auf das Protein-A-Gen (Xr-Region) für das *spa*-Typing

Die Primer, die zur Amplifikation der Xr-Region des Protein-A-Gens für die *spa*-Typisierung in das Mastermix eingesetzt wurden, hatten folgende Gensequenz (HARMSEN et al. 2003):

Primer forward: AgA CgA TCC TTC ggT gAg C

Primer reverse: gCT TTT gCA ATg TCA TTT ACT g

Das Amplikon, das nach der PCR durch die Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht wurde, hatte eine variable Größe. Das Produkt wurde zur Sequenzierung weiterverarbeitet (s. 3.11.1)

3.10.1.10 Untersuchung auf das *mecA*-Gen

Die Primer, die zur Amplifikation des Thermonuklease-Gens in das Mastermix (s. 3.10.1.2) eingesetzt wurden, hatten die folgende Gensequenz (LEE 2003):

Primer forward: AAA ATC gAT ggT AAA ggT Tgg C

Primer reverse: ACT TCT gCA gTA CCg gAT TTg C

Nach Einsetzen der Proben in den Cyclor wurde das folgende Temperaturprogramm gestartet:

1x	95°C	3min	initiale Denaturierung
40x	94°C	30sec	Denaturierung
	55°C	30sec	Annealing
	72°C	60sec	Elongation
1x	72°C	5min	Renaturierung

Das Amplikon, das nach der PCR durch die Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht wurde, hatte eine Größe von 533 bp.

3.10.2 Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese (Pfge)

Die Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels Pfge erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von SOMMERHÄUSER (2000).

3.10.2.1 Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA

Zur Präparation der Gesamtzell-DNA der *S.aureus*-Kolonien wurde zunächst eine Kolonie einer auf Blutplatte in Reinkultur gewachsenen Bakterienkultur in 5ml Standard-I-Nährbouillon (Merck) eingerieben und 24h bei 37°C aerob bebrütet.

Danach erfolgte als Waschschrir eine Zentrifugation für 10min bei 4.000rpm. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 3ml gekühltem TE-Puffer (s. Anhang) resuspendiert. Die Zentrifugation wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt und das Pellet anschließend je nach Größe in 50-75µl TE-Puffer gelöst. Eine Einstellung der Dichte auf 4,5% Transmission bei 620nm erfolgte im Photometer. Pulsed-Field-Certified Agarose (Bio-Rad) und die Bakteriensuspension wurden im Wasserbad auf 56°C temperiert und zu gleichen Teilen in einem 2ml Eppendorf-Gefäß gemischt. Danach wurden Blöckchen in einer Gießform zu je 100µl gegossen.

Die Lyse der Zellwand erfolgte über Nacht bei 37°C pro Blöckchen in 200µl Lysispuffer (s. Anhang), 20mg/ml Lysozym (Merck) und 5U/ml Lysostaphin (Sigma). Anschließend wurde eine Deproteinisierung durch die Zugabe von 0,5mg/ml Proteinase K über Nacht bei 56°C

durchgeführt. Die Inaktivierung der Proteinase K wurde nach zweimaligem Waschen mit 200µl TE-Puffer durch zweimalige Inkubation mit 2µl/Blöckchen Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Merck) für eine Stunde erreicht. Nach erneutem Waschen bei Raumtemperatur mit TE-Puffer konnten die Blöckchen direkt in den Restriktionsverdau eingesetzt werden oder bei 4°C gelagert werden.

Der Restriktionsverdau wurde in folgender Lösung angesetzt und erfolgte für 5h bei 25°C:

2 µl *Sma*I
20 µl Puffer A (10x; Promega)
1 Blöckchen (DNA)
176 µl A. dest.
2 µl Bovines Serumalbumin (BSA, Promega)

3.10.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese

Das Auftrennen der nach 3.10.2.1 präparierten DNA erfolgte in einem 1%igen Agarosegel (Pulsed-Field-Certified Agarose, Bio-Rad). Bevor die flüssige Agarose in die Gelkammer mit Kamm gegossen wurde, wurden 2-3ml Agarose in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 56°C im Wasserbad temperiert, um die Geltaschen nach Befüllen mit den Blöckchen zu verschließen. Nach dem Restriktionsverdau wurde in jede Geltasche blasenfrei ein Blöckchen geschoben und die Geltasche mit der flüssigen Agarose verschlossen. Die erste Geltasche wurde mit den Längenstandards „Lambda Ladder Pfg“ (50-1000Kb, Sigma) und „Low Range Marker“ (0,1-200Kb, Sigma) befüllt und ebenfalls verschlossen.

Die Elektrophorese erfolgte im „Pulse Field Electrophoresis System“ (Chef DR II-Elektrophorese-Gerät, Bio-Rad) in gekühltem 0,5x TBE-Puffer als Laufpuffer unter folgenden Bedingungen:

Laufprogramm	Lauf I	Lauf II
Pulszeiten	0,1-11s	9-40s
Spannung	5V	6V
Temperatur	14°C	14°C
Dauer	8h	13,5h

3.10.2.3 Ethidiumbromidfärbung

Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente mittels Ethidiumbromidfärbung (5U/μl, Merck) für 20min angefärbt. Unspezifische Ethidiumbromidanlagerungen wurden durch zweimaliges Waschen des Gels mit A. dest. entfernt.

Die Auswertung und photographische Dokumentation erfolgte anschließend unter UV-Licht mittels Gel-Video-Dokumentationssystem (Pharmacia Biotech).

3.10.2.4 Auswertung der Pffe-Muster

Die visuelle Auswertung der Bandenmuster nach Restriktionsanalyse wurde nach den von TENOVER et al. (1995) vorgegebenen Kriterien durchgeführt. Pffe-Muster, die keinen Unterschied in der Bandengröße und -anzahl zeigten, wurden als identische Stämme beurteilt, Muster mit zwei bis drei unterschiedlichen Banden wurden als „closely related“ (Subtyp) identifiziert, und Muster mit mehr als vier Fragmentabweichungen stammten demnach von unterschiedlichen Typen.

Isolate mit max. drei unterschiedlichen Fragmenten wurden in eine gemeinsame Abstammungslinie gruppiert (BOOTH et al. 2001).

Zusätzlich wurde mittels Computer-unterstützter Musteranalyse ein Dendrogramm als erhaltene Dienstleistung erstellt.

3.11 Staphylokokken-Protein-A (spa)-Typisierung

3.11.1 Vorbereitung der Amplifikate

Zur Vorbereitung der *spa*-Typisierung wurde eine PCR der *Xr*-Region des Protein-A-Gens durchgeführt (s. 3.10.1.9). Sofern die gelelektrophoretische Auftrennung eine deutliche und saubere Bande zeigte, wurde das Amplifikat mittels E.Z.N.A. ®MicroElute Cycle Pure Kit (Omega bio-tek, Norcross, USA) aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma Sequence Laboratories Göttingen (Deutschland) gesendet.

3.11.2 Auswertung der Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte zunächst mit der Software „Chromas Pro“. Mit dieser Software wurde die Reinheit der einzelnen Basenidentifikationen beurteilt. Nach dem Entfernen der ersten und letzten nicht eindeutig zu identifizierenden Basen wurden die

Sequenzen einem BLAST-Abgleich unter www.pubmed.com unterzogen. Sofern die eingegebene Sequenz dem Protein-A-Gen von *S. aureus* zugeordnet werden konnte, erfolgte ein Vergleich der Sequenzen untereinander anhand der Software „Chromas Pro“. Sofern es sich um identische Sequenzen handelte, wurde nur eine dieser Sequenzen zur Auswertung weitergeleitet.

Insgesamt erfolgte die *spa*-Typisierung von 70 Sequenzen (12 aus dem Sanierungsbetrieb und 58 aus den weiteren hessischen Isolaten) mittels Software Ridom StaphType (Ridom GmbH, Deutschland) als erhaltene Dienstleistung im Nationalen Referenzlabor für koagulase-positive Staphylokokken einschließlich *Staphylococcus aureus* am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin.

4 Ergebnisse

4.1 Viertelgemelksproben

Insgesamt wurden während des Untersuchungszeitraumes September 2007 bis November 2008 3084 VAG untersucht. Dabei konnte aus 276 Vierteln (8,9%) bei 200 Tieren *S. aureus* isoliert werden, wobei von 65 Vierteln (57 Tieren) die Isolate aus Doppelproben (zwei Proben eines Tieres werden unmittelbar nacheinander genommen) stammten. Somit ergibt sich eine Gesamtzahl von 143 Tieren und 201 Eutervierteln, die über den Untersuchungszeitraum in dem Betrieb mit positivem Ergebnis auf *S. aureus* untersucht wurden. Es wurden 41 Isolate (20,4%) im Euterviertel vorne rechts nachgewiesen, 49 Isolate (24,4%) stammten aus dem Viertel vorne links, 56 Isolate (27,9%) wurden im Viertel hinten rechts gefunden, und bei 55 Eutervierteln hinten links (27,3%) konnte eine Infektion mit *S. aureus* festgestellt werden. Bei dieser Auswertung wurden die Isolate aus Doppelproben nicht berücksichtigt.

Bei der Auswertung der Prävalenzen muss beachtet werden, dass die Tiere des Bestandes mehrfach untersucht wurden und der *S. aureus*-Nachweis bei vielen Tieren mehrfach bestätigt wurde.

Die isolierten Stämme lagen in der Primärkultur überwiegend als Reinkulturen vor. Die Median der Zellzahlen der betroffenen Viertel betrug 396.000 Zellen/ml.

Die Penicillinase-Bildung wurde nach der phänotypischer Identifizierung (s. 3.9) bei 226 *S. aureus*-Stämmen getestet. Nur zwei Isolate, die von einem zugekauften Tier stammten, reagierten negativ.

4.1.1 Vergleich der verschiedenen Ausstrichverfahren

Die Ergebnisse der Viertelgemelksuntersuchungen mittels verschiedenen Ausstrichverfahren sind in den Abbildungen 4.1-4.3 dargestellt.

Die Anzahl der Proben mit kulturell keinem Wachstum (kkW) sank von Methode A (31 Proben kkW) über Methode B (22 Proben kkW) bis zu 11 Proben bei Methode C (s. Abb. 4.1).

Bei der Untersuchung nach Methode A (DVG) wurden in drei Proben eine Mischkultur mit mehr als einer Bakterienspezies identifiziert. Demnach waren bei 97 Proben entweder keine oder eine Reinkultur nachzuweisen.

Durch das Ausstreichen von 100µl Milch mittels Glasspatel auf Blut-Agar (Methode B) erhöhte sich die Anzahl der Proben mit Mischkultur auf 15.

Nach Methode C (1ml Milch auf Blut-Agar mittels Schwenken der Platte verteilen, anschließend Platte ausklopfen) lag die Anzahl der Mischkulturen bei 22.

Bei allen drei Untersuchungsmethoden konnten in keiner Probe mehr als zwei unterschiedliche Bakterienspezies gefunden werden.

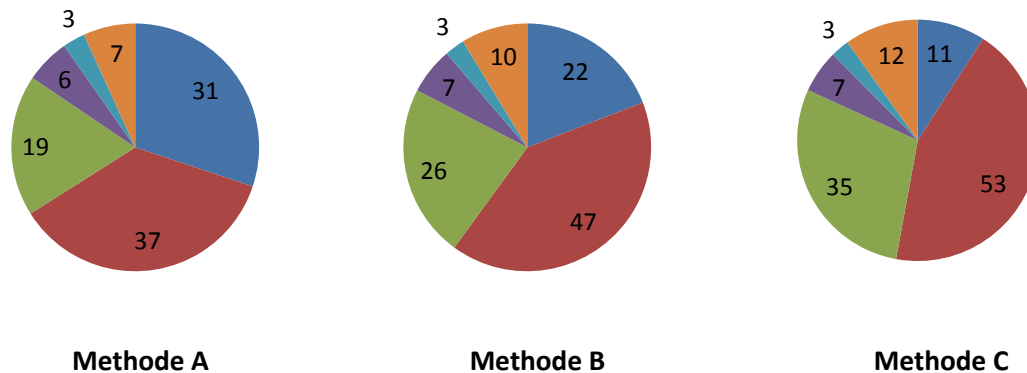


Abbildung 4.1: Ausstrich- Methoden A-C

Legende zu Abbildung 4.1: orange= *S. aureus*, dunkelblau= kulturell kein Wachstum (kkW), rot= *Corynebacterium sp.*, grün= KNS; lila= SCÄ, hellblau= Coliforme Keime

Beim Vergleich der Nachweisrate unterschiedlicher Keime wurden mittels Methode C vermehrt *Corynebacterium sp.*(2), KNS (3) und *S. aureus* (6) gefunden (s. Abbildung 4.2). Mittels Methode A wurden im Vergleich zu Methode B drei Tiere nicht als *S. aureus*-positiv erkannt. Methode C erkannte zwei weitere Tiere als *S. aureus*- positiv.

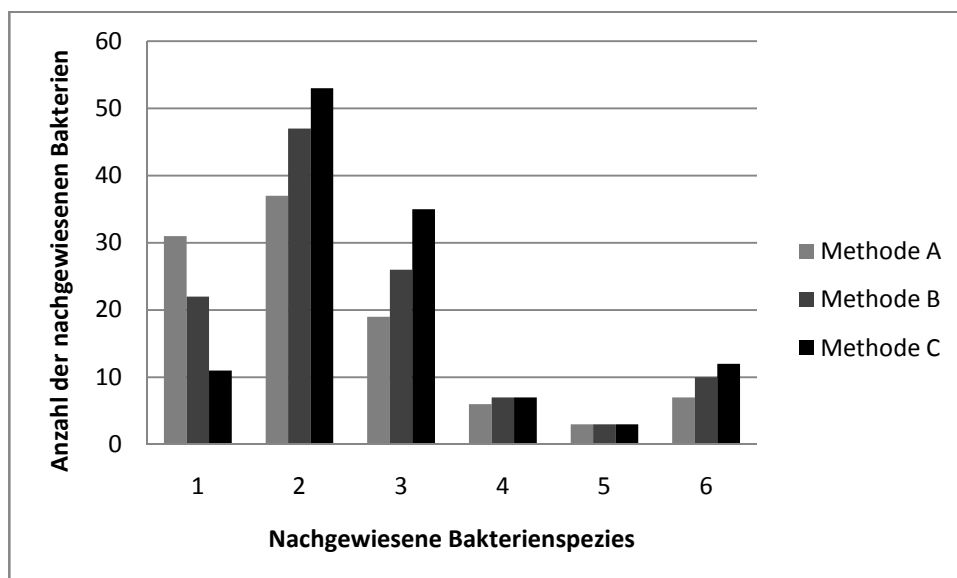


Abbildung 4.2: Verteilung der Keimnachweise aufgeteilt nach Keimgruppen; 1= kulturell kein Wachstum (kkW), 2= *Corynebacterium sp.*, 3= KNS; 4= SCÄ, 5= Coliforme Keime, 6= *S. aureus*

In den VAG der fünf Tiere, die mittels Methode A nicht erkannt wurden, wurde eine Zellzahl im Bereich <100.000 Zellen/ml festgestellt. Bis auf eine Probe wiesen die sieben *S. aureus*-positiven Proben, die mit allen drei Methode erkannt wurden, eine Zellzahl von >200.000 Zellen/ml auf.

Der Vergleich der Doppelproben zeigte, dass *S. aureus* in den positiven Vierteln jeweils in beiden Proben nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von *Corynebacterium sp.* gelang bei vier Doppelproben nur in einer der beiden Proben. Unterschiedliche Ergebnisse der Doppelproben konnten auch bei der Identifizierung von coliformen Keimen, SCÄ (je ein Viertel) und KNS (zwei Viertel) festgestellt werden.

4.2 Umweltproben

Weder im direkten Ausstrich noch nach Anreicherung konnte aus einer der 69 untersuchten Tupferproben aus der Tierumgebung *S. aureus* isoliert werden.

4.3 Identifizierung des *S. aureus*

4.3.1 Phänotypische Identifizierung

S. aureus konnte durch das Wachstum von goldgelben, feucht glänzenden Kolonien mit einem Durchmesser von 2-3 mm und dem Vorhandensein der typischen Doppelzonenhämolyse (α - und β -Hämolyse) identifiziert werden (s. Abbildung 4.3: *S. aureus*-Subkultur nach 24h (a) - bzw. 48h (b) Bebrütung bei 37°C). 229 isolierte Stämme zeigten das für *S. aureus* typische Bild der Doppelzonenhämolyse und konnten gemäß der Leitlinien zunächst allein anhand der Koloniemorphologie als *S. aureus*-verdächtig identifiziert werden. Zur Absicherung wurde ein Koagulasetest nach 3.9.2 durchgeführt. Diese 229 Stämme wurden der weiterführenden Diagnostik unterzogen.

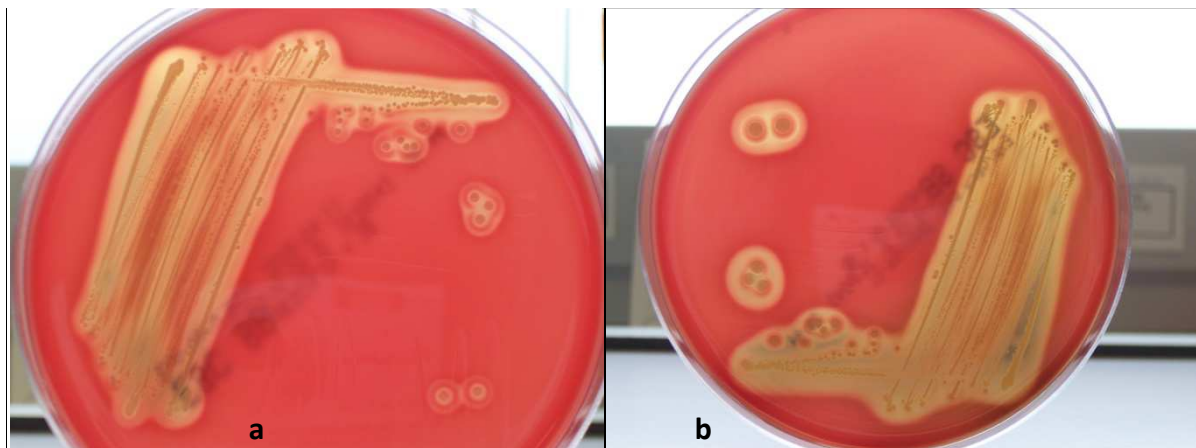


Abbildung 4.3: *S. aureus*-Subkultur nach 24h (a) - bzw. 48h (b) Bebrütung bei 37°C

4.3.1.1 Koagulasetests

Es wurde eine Auswahl von 229 Isolaten (aus 47 Tieren) mittels Röhrchen-Koagulasetest untersucht. Davon zeigte sich bei 226 Isolaten nach einer Inkubationszeit von 24h ein Koagulieren des Kaninchensерums. Damit waren diese Isolate Koagulase-positiv und wurden als *S. aureus* identifiziert. Bei drei Isolaten verlief die Koagulasereaktion negativ.

4.3.1.2 Bestätigung durch VITEK2

Insgesamt wurden 178 Stämme von 46 Tieren per VITEK2 untersucht. Isolate aus Doppelproben wurden nur einmal mittels VITEK2 untersucht. Bei 175 Isolaten wurde *S. aureus* mit einer Wahrscheinlichkeit von 88-99% identifiziert. Ein Isolat wurde als *Aerococcus viridans* identifiziert. Zwei weitere Isolate konnten nicht bestimmt werden. Diese 3 Isolate wurden bei der genotypischen Identifizierung nicht mehr berücksichtigt. Es handelte sich hierbei um die

drei im Koagulasetest negativ untersuchten Isolate.

4.3.2 Genotypische Identifizierung

4.3.2.1 PCR-Auswertung

Nach der phänotypischen Identifizierung erfolgte das Einfrieren der Isolate in 6%iger Glucoselösung unter Zusatz von Bovinem Serumalbumin (BSA). Die genotypische Untersuchung wurde nach Auftauen und Rekultivierung der Isolate durchgeführt. Insgesamt wurden 218 Isolate von 44 Tieren in der PCR auf das Vorhandensein spezifischer Gensequenzen untersucht. Acht Isolate konnten nach dem Einfrieren nicht mehr angezüchtet werden.

4.3.2.1.1 *Thermonuklease-Gen*

Bei allen getesteten Isolaten konnte die speziesspezifische Gensequenz des Thermonuklease-Gens mit einer Amplikongröße von 279 bp nachgewiesen werden.

4.3.2.1.2 *Koagulasegen-Polymorphismus*

Mit Ausnahme von sechs Isolaten (2,75%) zeigten alle übrigen isolierten Stämme (n=212) eine Amplikongröße des Koagulasegens von 620 bp.

Bei vier Isolaten wurde eine Amplikongröße von 900 bp gefunden. Diese vier Isolate stammten alle vom selben Tier (Nr. 17). Bei zwei Isolaten, die von derselben Kuh stammten, hatte das Amplifikat des Koagulasegens eine Größe von 650 bp (A-200, A-222).

Tabelle 4.1: Häufigkeit der verschiedenen Amplifikatgrößen des Koagulasegens

Amplifikatgröße	Anzahl Isolate (%)	Anzahl Kühe
620 bp	212 (97,25%)	42
650 bp	2 (0,92%)	1
900 bp	4 (1,83%)	1

4.3.2.1.3 *IgG-bindende Region des Protein-A-Gens*

Bei allen eingesetzten Isolaten konnte die spezifische Gensequenz der IgG-bindenden Region des Protein-A-Gens mit einer Amplikongröße von 920 bp nachgewiesen werden.

4.3.2.1.4 Polymorphismus des Xr-Region des Protein-A-Gens

Bei der genetisch hochvariablen Xr-Region des Protein A-Gens konnten vier verschiedene Größen des Amplikons nach der PCR der 218 Isolate gefunden werden.

208 (95,4%) Isolate hatten eine Amplikongröße von 320 bp. Bei sieben Isolaten (A-13, A-33 A-47, A-90, A-91, A-200, A-222) war das Amplikon 350 bp groß. Vier Isolate stammten von dem Tier Nr. 17.

Des Weiteren wurden zwei Isolate (A-112, A-186) mit einer Amplikongröße von 200 bp nachgewiesen und ein Isolat mit einer Größe von 100 bp (A-191).

Tabelle 4.2: Häufigkeit der verschiedenen Amplifikatgrößen der Xr-Region des Protein-A-Gens

Amplifikatgröße	Anzahl Isolate (%)	Anzahl Kühe
320 bp	208 (95,4%)	42
350 bp	7 (3,2%)	3
200 bp	2 (0,9%)	2
100 bp	1 (0,5%)	1

4.3.2.1.5 Zusammenfassung der genotypischen Untersuchungen mittels PCR

Die Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Aufgrund der Polymorphismen im Protein A-Gen (Xr-Region) und Koagulasegen ergaben sich sechs verschiedene „PCR- Typen“. Die IgG-bindende Region des Protein A-Gens zeigte bei den hier untersuchten 218 Stämmen keinen Polymorphismus. Das Amplifikat hatte eine Länge von 920 bp. Bei der Amplifizierung der Xr-Region des Protein A-Gens wurden vier verschiedene Genotypen erkannt. Das Koagulasegen hatte drei verschiedene Amplifikatgrößen.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der PCR-Polymorphismen

PCR-Typ	Protein A- Gen Xr-Region (bp)	Protein A- Gen IgG-bindende Region (bp)	Koagulasegen (bp)	Anzahl Isolate
1	320	920	620	208
2	200	920	620	2
3	350	920	900	4
4	350	920	650	2
5	350	920	620	1
6	100	920	620	1

4.3.2.2 Makrorestriktionsanalyse

Insgesamt wurden 80 Isolate (17 Kühe) mittels Pfgc untersucht, wobei mindestens zwei Isolate von jeder Kuh ausgewählt wurden. Die Untersuchungszeitpunkte, von denen diese Isolate stammten, lagen zwischen September 2007 und Mai 2008.

4.3.2.2.1 Visuelle Auswertung

Die visuelle Auswertung erfolgte nach den von TENOVER et al. (1995) beschriebenen Kriterien (s. 3.10.2.4). Dabei wurden alle Restriktionsmuster der untersuchten Isolate miteinander verglichen. Isolate mit identischen Bandenmustern wurden als identische Stämme beurteilt. Isolate mit ein bis drei Bandenunterschieden waren „closely related“, und mehr als drei Bandenunterschiede zeigten nicht verwandte Stämme (Bsp. s. Abb. 4.4).

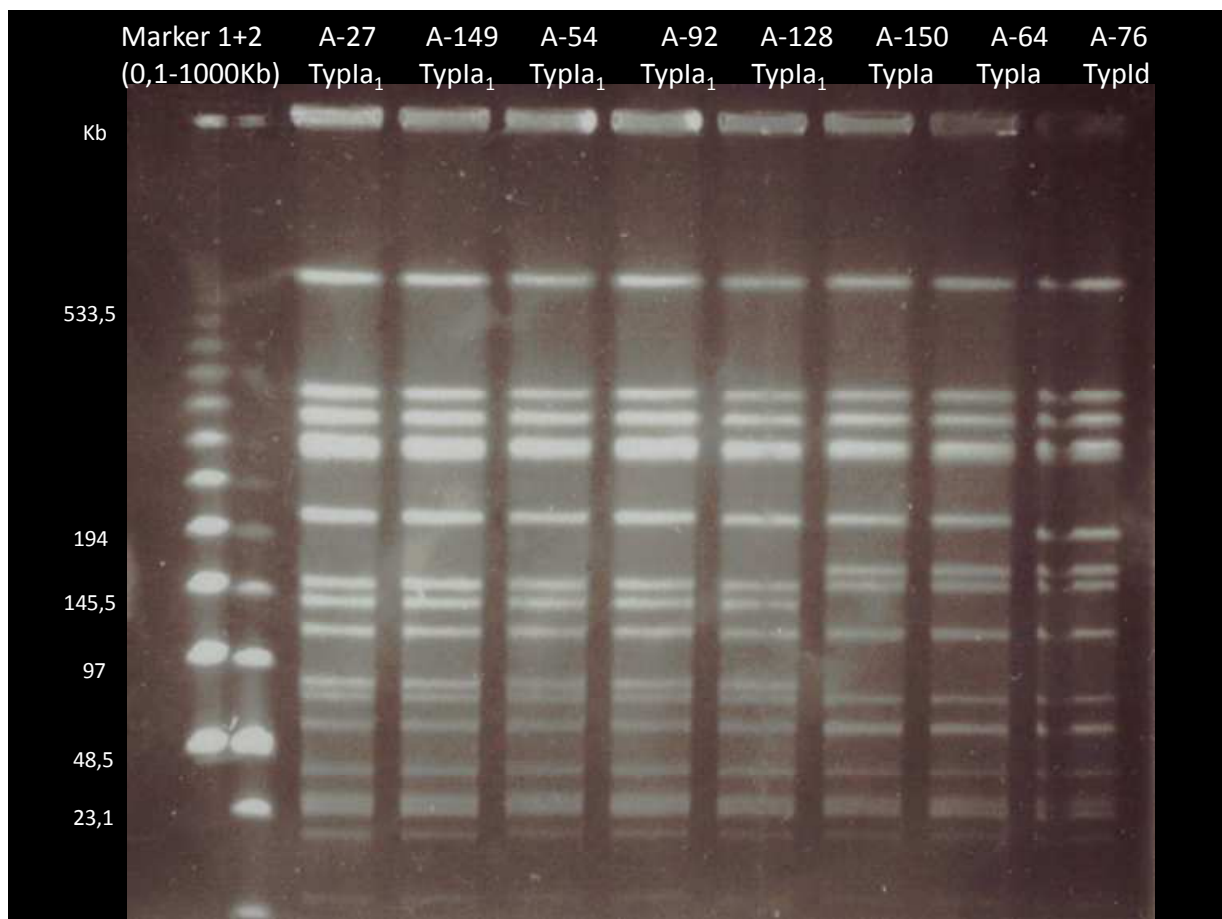


Abbildung 4.4: Makrorestriktionsanalyse von acht S.aureus-Kulturen nach Restriktionsverdau mit dem Enzym SmaI; Marker 1 = Lambda Ladder Pfgc Marker 50-1000 kB; Marker 2 = Low Range Pfgc Marker 0,1-200 kB

Die Auswertung nach diesem Schema ergab zwei nicht verwandte Pfgc-Typen, die Typen I und II. Typ I beinhaltete insgesamt neun Subtypen Ia bis Ij, wobei von Typ Ia ein weiterer Subtyp Ia₁ bestimmt werden konnte. Verteilung und Anzahl der unterschiedlichen Pfgc-Typen ist in Tab.

4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Verteilung der Pfge-Typen auf Euterviertel- und Tierebene nach visueller Auswertung nach TENOVER et al. (1995)

Pfge-Typ	Anzahl Viertel (%)	Anzahl Tiere	Bandenunterschiede zu Pfge-Typ I	Pfge-Typ	Anzahl Viertel (%)	Anzahl Tiere	Bandenunterschiede zu Pfge-Typ I
I	9 (11,25%)	5	-	Ie	3 (3,75%)	2	3
Ia	6 (7,5%)	5	3	If	6 (7,5%)	2	2
Ia₁	23 (28,75%)	9	4	Ig	1 (1,25%)	1	2
Ib	13 (16,25%)	6	1	Ih	4 (5,0%)	1	2
Ic	1 (1,25%)	1	2	Ij	1 (1,25%)	1	2
Id	11 (13,75%)	6	2	II	2 (2,5%)	1	4

Die Verteilung der Pfge-Typen bei den 17 untersuchten Tieren ist in Abb. 4.5 dargestellt.

Bei insgesamt 14 Tieren wurden während des Untersuchungszeitraums mindestens zwei verschiedene Pfge-Subtypen nachgewiesen (s. Abb. 4.5).

Bei nur drei Tieren konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum ein identischer Pfge-Typ gefunden werden. Der Pfge-Typ II konnte lediglich bei einem Tier (Tier 17) nachgewiesen werden. Zwei Tiere (Tier 5 und 16) zeigten jeweils nur einen Pfge-Typ (Pfge-Typen Ib bzw. If), die aber auch bei anderen Tieren aus dem Bestand vorkamen (s. Abb. 4.4).

Bei Tier 5 wurde zu drei Untersuchungszeitpunkten jeweils das Isolat des Pfge-Typs Ib nachgewiesen. Eines dieser Isolate stammte aus der ersten Gesamtbestandsuntersuchung im September 2007, die beiden anderen Isolate dieses Tieres wurden in Doppelproben im Mai 2008 nachgewiesen.

Bei Tier 16 stammte das Isolat aus Dezember 2007 sowie Februar und März 2008.

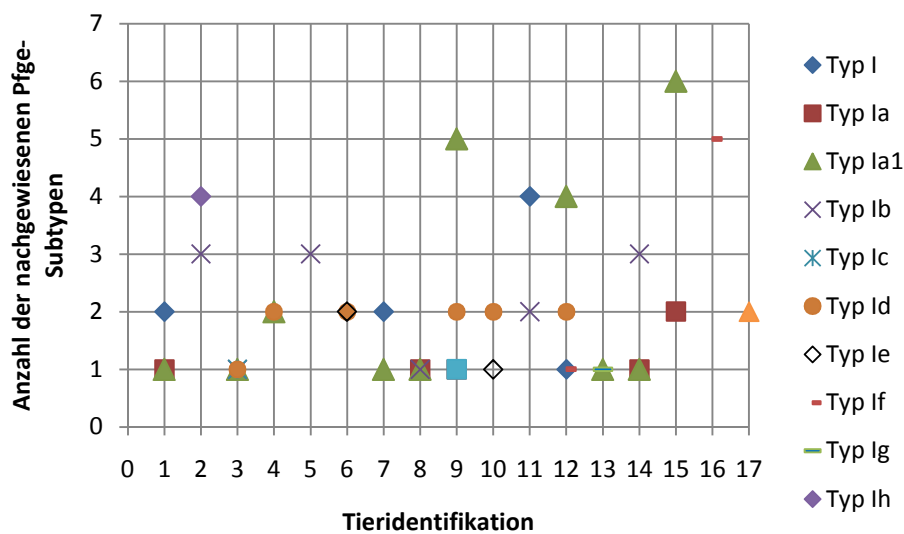


Abbildung 4.5: Verteilung und Nachweise der Pflge-Typen bei den 17 untersuchten Tieren nach visueller Auswertung nach TENOVER et al. (1995)

Zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten zwischen September 2007 und Mai 2008 wurden bei den Gesamtbestandsuntersuchungen je mindestens zwei verschiedene Pflge-Typen nachgewiesen (s. Abb. 4.5).

Im September 2007 wurden von neun Isolaten sechs Subtypen des Pflge-Typs I gefunden. Im November 2007 waren es bei 15 Isolaten sieben verschiedene Subtypen von Pflge-Typ I. Aus der Untersuchung im Dezember 2007 wurden nur drei Isolate per Pflge untersucht, diese gehörten zu zwei verschiedenen Pflge-Subtypen. Die 12 aus dem Februar 2008 stammenden Isolate wurden zu sechs Pflge-Subtypen zugeordnet. 19 Isolate aus dem März 2008 gehörten zu neun verschiedenen Pflge-Subtypen des Pflge-Typs I. Des Weiteren wurde in dieser Untersuchung zum ersten Mal der Pflge-Typ II gefunden. Auch im Mai 2008 wurde der Pflge-Typ II nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt wurden von 22 Isolaten außerdem sieben verschiedene Pflge-Subtypen des Pflge-Typs I festgestellt.

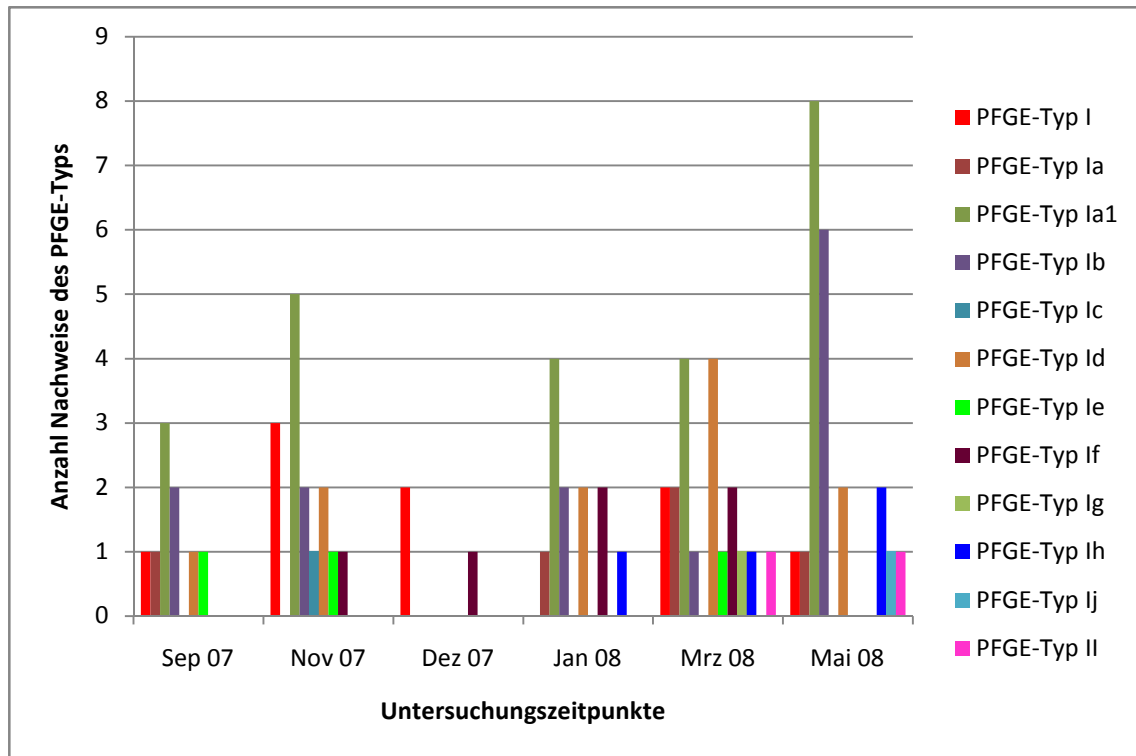


Abbildung 4.6: Nachweise der Pfg-Types an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten

4.3.2.2.2 Dendrogrammanalyse

Von den 80 Restriktionsmustern wurde ein Dendrogramm zur Eingruppierung der nachgewiesenen Pfg-Types in eine Abstammungslinie erstellt. Die Namenskodierung der Pfg-Isolate befindet sich im Anhang in Tabelle 12.1.

Alle Isolate zeigten bei einem Dice-Koeffizienten von 5% Toleranz eine Übereinstimmung bis zu 85%. Bei 79 Isolaten (98,8%; außer Pfg-Typ Ic) lag die Übereinstimmung sogar bei mindestens 91%.

Insgesamt ergaben sich 13 Gruppen, in denen zwischen ein und 21 Isolaten als 100% übereinstimmend zusammengefasst wurden (s. Abb. 4.7).

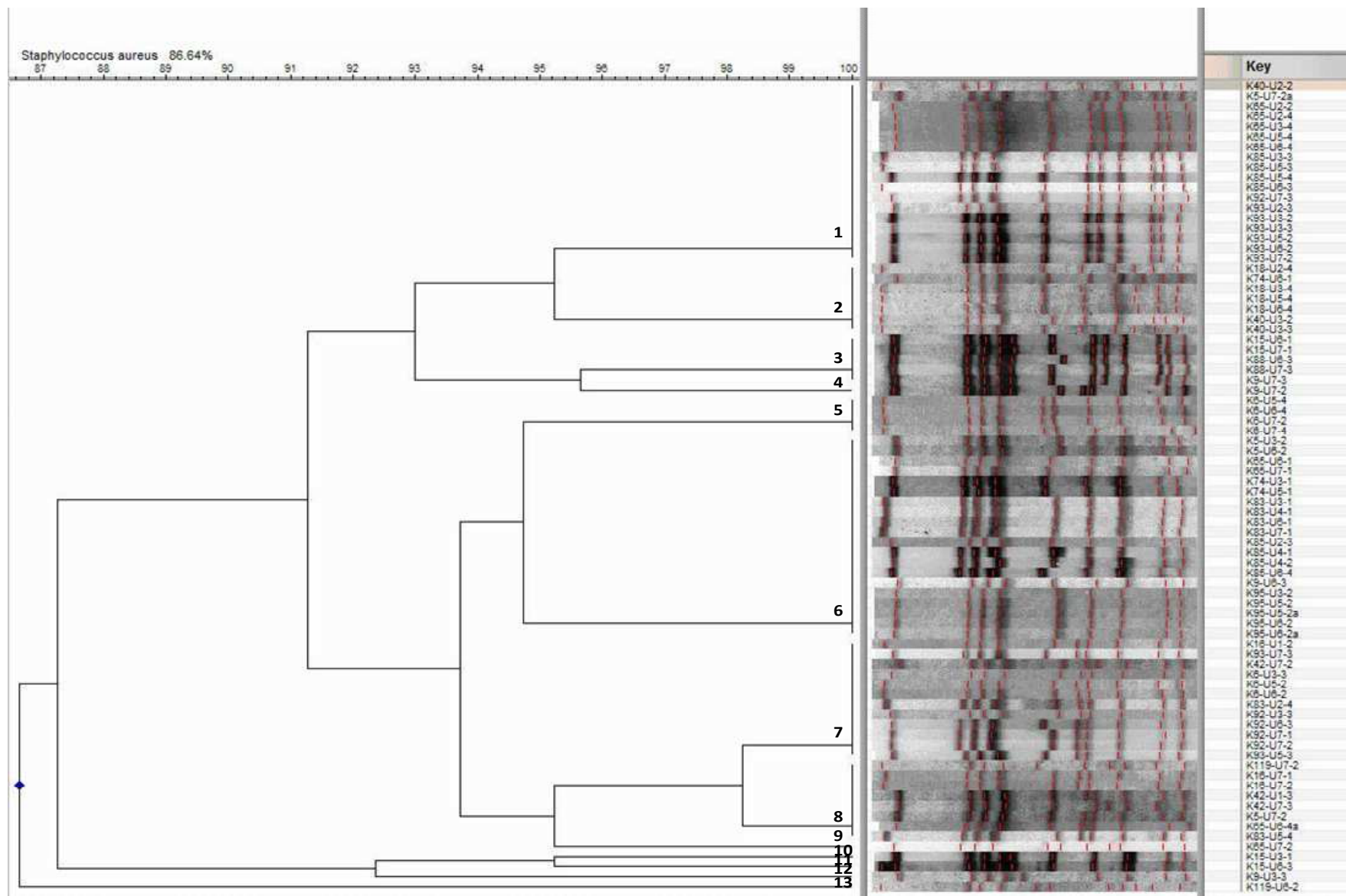


Abbildung 4.7: Dendrogrammanalyse der 80 Restriktionsmuster; Dice (Tol5,0%-5,0%)

4.3.2.3 *spa*-Typisierung aus dem Sanierungsbetrieb

Die Protein A-Gensequenzen der nach der visuellen Auswertung nachgewiesenen 12 unterschiedlichen Pfg-Typen bzw. -Subtypen wurden am BfR mittels Software Ridom StaphType ausgewertet.

Diese 12 Isolate der unterschiedlichen Pfg-Typen bzw. -Subtypen wurden zwei verschiedenen *spa*-Typen zugeordnet:

- 11 Sequenzen (92%): *spa*-Typ t2067 mit den Basenwiederholungen: r11-r19-r12-r21-r66-r34-r24-r34-r22-r25 (entspricht den Pfg-Typ I und seinen Subtypen)
- eine Sequenz (8%): *spa*-Typ t2112 mit den Basenwiederholungen: r26-r23-r12-r21-r17-r34-r34-r34-r34-r33-r34 (entspricht dem Pfg-Typ II)

Die in der Datenbank unter <http://spa.ridom.de/spatypes.shtml> abrufbaren Informationen über die in diesem Bestand nachgewiesenen *spa*-Typen sind als Screenshots in den Abb. 4.8 und 4.9 dargestellt.

Ridom SpaServer: spa-t2067

SpaServer.ridom.de

Overview

- Home
- Background
- Policy
- Submit

Database

- Frequencies
- Spa-types
- Repeats
- MLST Mapping

Contact

- Imprint
- Contact us

Ridom SpaServer: spa-t2067

Spa-type:	t2067
Repeat succession:	11-19-12-21-66-34-24-34-22-25
Frequency:	0.00 %
Total strains:	1
Strain records:	1

Strain Records

Isolate ID	Isolation date	Submission date	Country	MRSA / MSSA	MLST	Association	Reliability	Submitter
CPSPA2_E06	15-Jun-2006	23-Jan-2007					excellent	

Last modified: 30-Oct-2009

Abbildung 4.8: Screenshot aus der Datenbank Ridom Spa Server zum *spa*-Typ t2067

Ridom SpaServer: spa-t2112

Spa-type:	t2112
Repeat succession:	26-23-12-21-17-34-34-34-33-34
Frequency:	0.01 %
Total strains:	12
Strain records:	1

Strain Records

Isolate ID	Isolation date	Submission date	Country	MRSA / MSSA	MLST	Association	Reliability	Submitter
09-02546	14-Aug-2009	17-Aug-2009	Germany	MSSA			excellent	

last modified: 25-May-2012

Abbildung 4.9: Screenshot aus der Datenbank Ridom Spa Server zum *spa*-Typ t2112

Von *spa*-Typ t2067 wurde bisher nur ein Isolat in die Datenbank eingestellt (Übermittlungsdatum: 23.01.2007). Es lagen bisher keine weiteren Informationen zu Methicillin-Resistenzen, Ergebnissen der MLST sowie dem Land, in dem der Stamm isoliert wurde, vor.

spa-Typ t2112 wurde bisher 12-mal an die Datenbank übermittelt. Es liegen allerdings nur über ein Isolat weitergehende Informationen vor. Es handelt sich hier bei um einen Methicillin-sensiblen Stamm, der in Deutschland am 14.08.2009 isoliert wurde. Weitere Informationen sind in der Datenbank nicht hinterlegt.

4.3.2.4 *spa*-Typisierung aus weiteren in Hessen isolierten bovinen *S. aureus*-Stämmen

58 der nach 3.8 ausgewählten Isolate bzw. Sequenzen wurden mittels *spa*-Typisierung untersucht. Diese Sequenzen konnten 28 *spa*-Typen zugeordnet werden.

Da vor der Typisierung eine Reduzierung der Isolate anhand des Sequenzvergleichs erfolgte (s. 3.11.2), konnten alle 92 Isolate aus Hessen diesen 28 *spa*-Typen zugeordnet werden (s. Tab. 4.5).

Tabelle 4.5: Verteilung der *spa*-Typen bei 92 bovinen *S. aureus*-Isolaten

<i>spa</i> -Typ	Repeat-Abfolge	Anzahl Isolate	prozentualer Anteil
t529	04-34	22	23,90%
t2873	04-20-17-31-24	20	21,73%
t011	08-16-02-25-34-24-25	6	6,52%
t1403	03-23-24	6	6,52%
t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	4	4,34%
t528	04	4	4,34%
t259	04-41-20-17-12-48-12	3	3,26%
t337	07-16-23-23-02-12-23-02-34	3	3,26%
t524	04-17	3	3,26%
t164	07-06-17-21-34-34-22-34	2	2,17%
t2844	07-16-34-33-34	2	2,17%
t005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28	1	1,09%
t024	11-12-21-17-34-24-34-22-25	1	1,09%
t034	08-16-02-25-02-25-34-24-25	1	1,09%
t091	07-23-21-17-34-12-23-02-12-23	1	1,09%
t11123	07-83-21-34-34-34-22-34	1	1,09%
t11124	07-16-23-23-34-23-02-34	1	1,09%
t11125	04-21-17-34-24-25	1	1,09%
t116	08-16-02-16-13-13-17-34-16-34	1	1,09%
t1736	04-82-17-25-16-17	1	1,09%
t174	14-21-16-34-33-13	1	1,09%
t224	07-23-12-21-17-34-33-34	1	1,09%
t2678	03-16-12-21-17-23-13-17-17-17-23-24	1	1,09%
t359	07-23-12-21-17-34-34-33-34	1	1,09%
t518	04-20-17-23-24-20-17-25	1	1,09%
t519	04-20-17-25	1	1,09%
t543	04-20-17	1	1,09%
t544	03-16-12-21-17-23-13-17-17-17-17-23-24	1	1,09%
Gesamt		92	100,00%

Zusätzlich wurde anhand des Algorithmus based upon repeat patterns (BURP) eine Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse durchgeführt. Daraus ergab sich, dass insgesamt sechs Cluster erstellt werden konnten. Neun Sequenzen konnten keinem Cluster zugeordnet werden. Cluster 1 war dem Clonal Complex *spa*-CC543 zuzuordnen. In dieses Cluster konnten die *spa*- Typen: t519, t524, t528, t529, t543, t1403 und t2873 eingeordnet werden (s. Abbildung 4.10: Darstellung des CC543 nach BURP-Analyse). Insgesamt konnten damit 57 (62%) von 92 Isolaten

nach dieser Methode als miteinander verwandt angesehen werden. Die Darstellung der sechs Cluster ist in Tab. 4.6 dargestellt.

Abbildung 4.10: Darstellung des CC543 nach BURP-Analyse

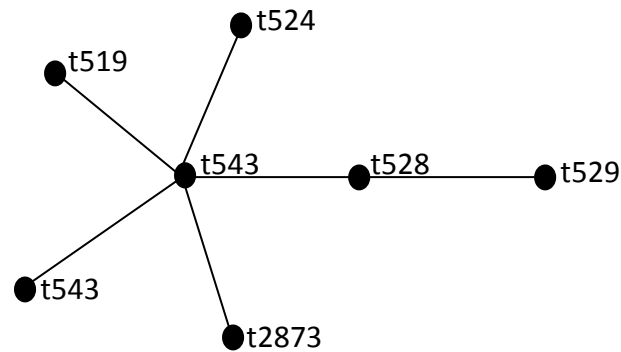


Tabelle 4.6: Darstellung der Clusteranalyse der gefundenen *spa*-Typen

<i>spa</i> -Cluster (BURP Analyse)	<i>spa</i> - Typen	Anzahl Isolate (%)
1 = CC543	t519, t524, t528, t529, t543, t1403, t2873	57 (62%)
2	t224, t359	2 (2%)
3	t337, t11124	4 (4%)
4	t011, t034	7 (8%)
5	t008, t024	5 (5,5%)
6	t544, t2678	2 (2%)
keinem Cluster zuzuordnen	t005, t091, t116, t164, t174, t259, t518, t1736, t2844, t11123, t11125,	15 (16,5%)

Die weite Verteilung der Isolate des CC543 innerhalb des hessischen Landesgebietes ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

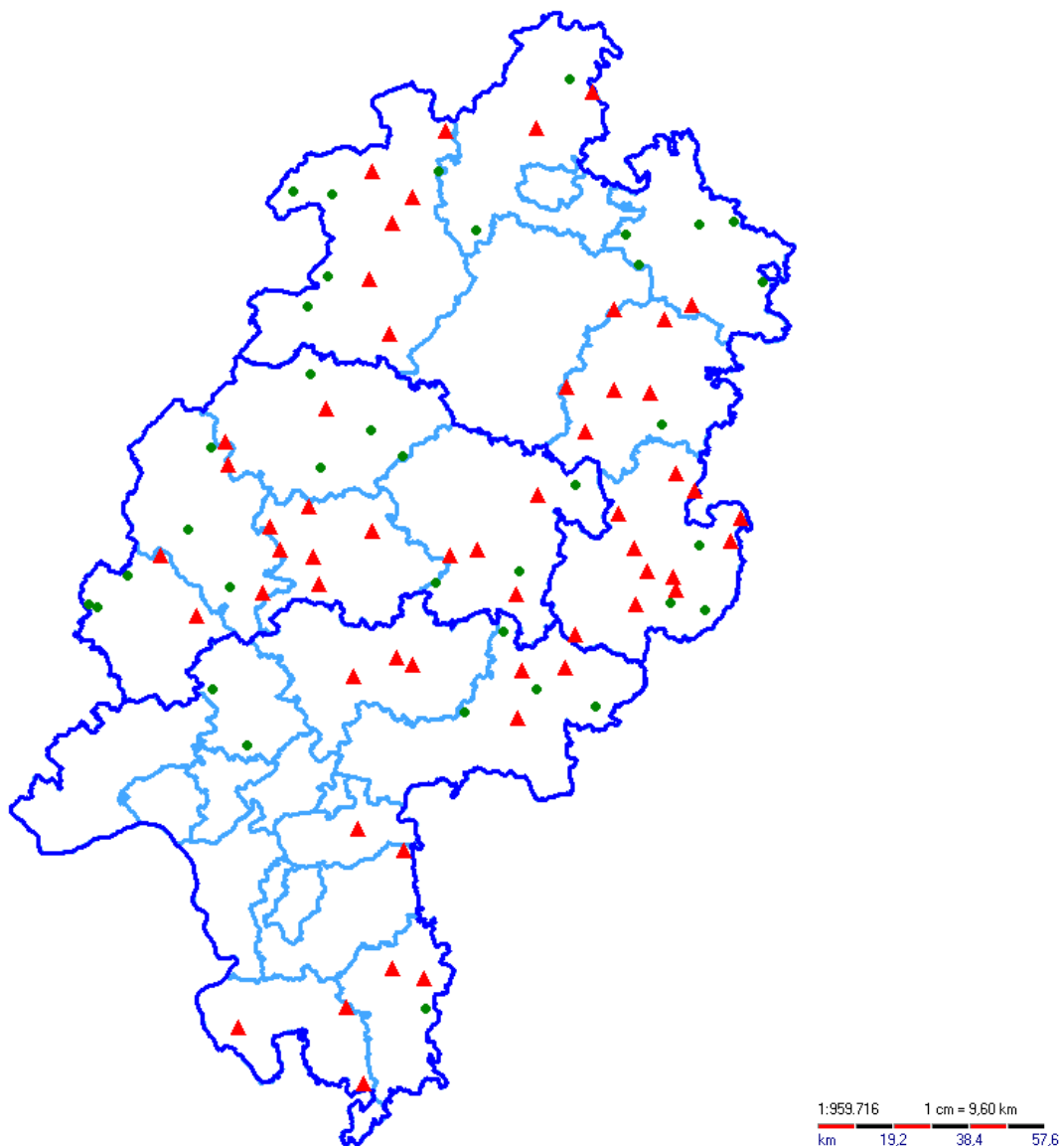


Abbildung 4.11: Verteilung der Isolate des CC543; Dreiecke: Isolate des CC543; Kreise: übrige Isolate

4.3.2.5 Zusammenfassung der genotypischen Untersuchungsergebnisse aus dem Sanierungsbetrieb

Bei der Kombination der genotypischen Untersuchungsmethoden aus dem Sanierungsbetrieb ergeben sich 13 unterscheidbare Genotypen. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 4.7 dargestellt.

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der genotypischen Untersuchungsergebnisse (PCR, Pfgc, *spa*-Typisierung)

<i>spa</i> -Typ	PCR-Typ	Pfgc-Typ	Anzahl Isolate
t2067	1	I	9
	1	Ia	6
	1	Ia ₁	21
	1	Ib	13
	1	Ic	1
	1	Id	11
	1	Ie	3
	1	If	6
	1	Ig	1
	1	Ih	4
	1	Ij	1
	2	Ia ₁	2
t2112	3	II	2

4.4 Anwendung des Sanierungskonzeptes

Das aufgestellte Sanierungskonzept wurde während des gesamten Untersuchungszeitraumes konsequent angewendet.

Durch regelmäßige Kontrolluntersuchungen, Betriebsbesuche und engen telefonischen Kontakt konnte die Durchführung des Sanierungsplans überprüft und ggf. mit den Landwirten besprochen werden.

4.5 Entwicklung des Gesamtbestandes

Die erste Gesamtbestandsuntersuchung im September 2007 (n= 102 Tiere) im Rahmen dieser Untersuchungen ergab eine *S. aureus*-Einzeltierprävalenz von 30% und eine Euterviertelprävalenz von 12%.

In einer Gesamtbestandsuntersuchung im November 2008 (n= 106 Tiere) wurde eine Prävalenz von 0,94% auf Einzeltierebene und 0,24% auf Euterviertelebene festgestellt.

Der Verlauf über verschiedene Gesamtbestandsuntersuchungen hinweg ist in Abb. 4.15 dargestellt.

S. aureus-positive Tiere, die im Laufe dieser Untersuchungen bei VAG-Gesamtbestandsuntersuchungen durch *S. aureus*- Nachweise in mehr als zwei Vierteln auffällig wurden, wurden umgehend verkauft. Außerdem wurden positive Tiere verkauft, sofern sie keine ausreichende Milchmenge lieferten. Da die positiven Tiere nicht wieder besamt wurden, reduzierte sich im Laufe des Untersuchungszeitraums die Anzahl der Tiere in der *S. aureus*-

positiven Gruppe. Ab September 2008 mussten die Tiere nicht mehr in zwei Gruppen gehalten bzw. gemolken werden, da alle bekannt positiven Tiere den Betrieb verlassen hatten. Im November 2008 wurde erneut bei einem Tier, das bei der Untersuchung im August trockenstand, eine *S. aureus*-Infektion nachgewiesen. Auch dieses Tier wurde umgehend verkauft.

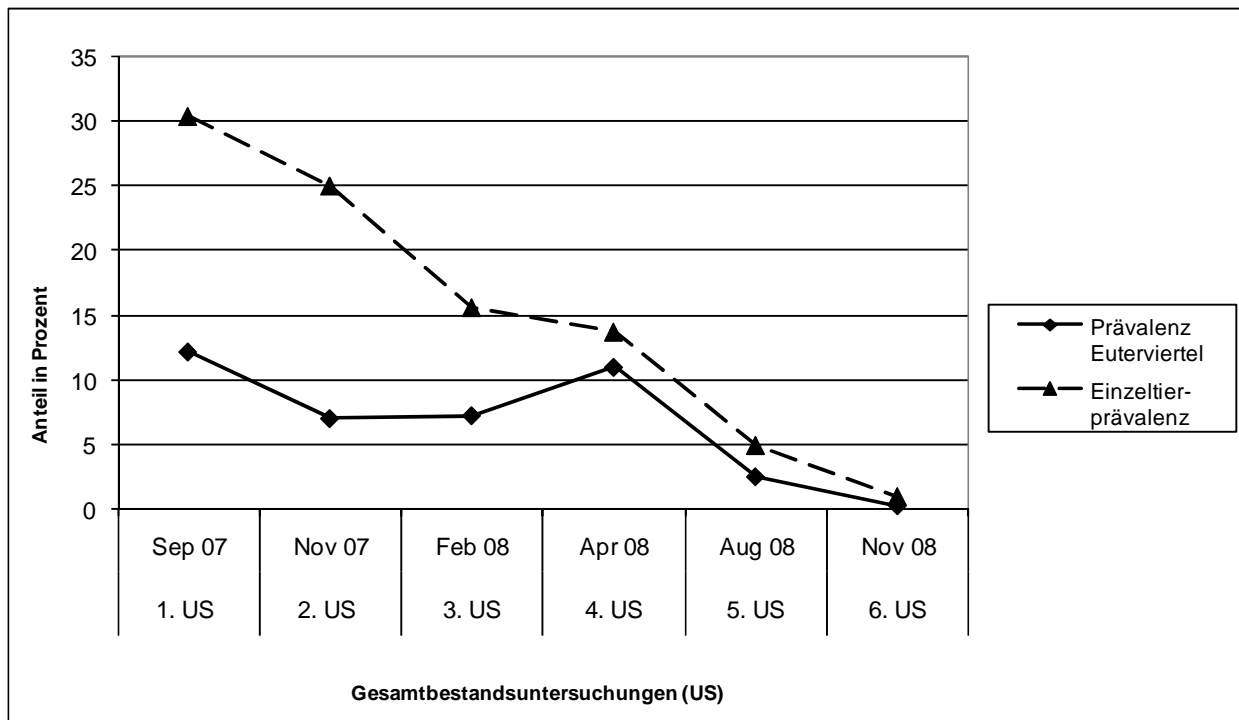


Abbildung 4.12: Verlauf der *S. aureus*- Prävalenzen auf Euterviertel- und Einzeltierebene in VAG aus Gesamtbestandsuntersuchungen

Während der gesamten Untersuchungsperiode wurden alle Färsen unmittelbar nach dem Abkalben zytobakteriologisch untersucht.

Insgesamt bestand der Betrieb im Oktober 2008 aus 53 Tieren, die innerhalb der letzten 12 Monate zum ersten Mal gekalbt hatten (= Erst-Laktierende), 28 Tiere befanden sich in der zweiten Laktation, 12 Tiere in der dritten Laktation und 19 Tiere in einer \geq vierten Laktation.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde bei 40 Tieren eine *S. aureus*- Infektion nachgewiesen. 31 Tiere wurden innerhalb des Untersuchungszeitraumes aufgrund chronischer *S. aureus*- Mastitis verkauft. Bei sieben Tieren konnte eine Heilung nach Therapie mit Antibiotika festgestellt werden. Bei zwei Tieren konnte in den Gesamtbestandsuntersuchungen ab April 2008 kein *S. aureus* in VAG nachgewiesen werden, sodass in diesen beiden Fällen eine Spontanheilung vermutet werden kann.

5 Diskussion

5.1 *S. aureus*-Identifizierung

Bei der Diagnostik von *S. aureus* aus VAG ist es zunächst entscheidend, welche Konsequenzen sich aus einem positiven bzw. negativen Ergebnis ergeben. Geht es um den Nachweis von *S. aureus* in Bezug auf eine Bestandsdiagnostik und schließen sich an die durchgeführte Untersuchung weitere Gesamtbestandsuntersuchungen an, so ist es nicht notwendig, alle infizierten Tiere zu identifizieren. In diesem Fall steht die Bestandsdiagnose im Vordergrund mit allen für alle Tiere sich anschließenden Hygienemaßnahmen (s. 2.3.2), um Infektionen von Kuh zu Kuh zu vermeiden und den Infektionsdruck zu senken (DVG 2009). Durch die intermittierende Ausscheidung von *S. aureus* ist die Wahrscheinlichkeit bei VAG-Untersuchungen alle positiven Tiere zu erkennen - unabhängig von der Sensitivität der eingesetzten Untersuchungsmethode - nie 100%. Trotzdem kann es bei einer Einzeltierdiagnostik sinnvoll sein, den tatsächlichen Infektionsstatus eines Tieres herauszufinden (s. 5.3). Um ggf. die Sensitivität der Untersuchungsmethode in einem solchen Fall zu erhöhen, wurde der Versuch der unterschiedlichen Ausstrichverfahren durchgeführt (s. 5.1.1). Daraus ergab sich, dass - wie bei HAMANN et al. (1998) bereits beschrieben - die Sensitivität der Methode mit größerem Inokulat ansteigt. Allerdings ließ sich auch feststellen, dass der Nachweis von minor-pathogenen Bakterien und Umwelterregern beim Einsatz von größeren Untersuchungsvolumina ebenfalls anstieg. Damit ergibt sich auch eine geringere Spezifität der Untersuchungsergebnisse. Aus diesem Grund sollte bei einer Gesamtbestandsuntersuchung die in den DVG-Leitlinien vorgegebene Methode als Goldstandard beibehalten werden.

Die durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen der Umweltproben verliefen mit negativem Ergebnis auf das Vorhandensein von *S. aureus*. Wie bei SOMMERHÄUSER et al. (2003) beschrieben, gibt es unterschiedlich kontagiöse *S. aureus*-Stämme. In der vorliegenden Untersuchung konnte ein *S. aureus*-Stamm mit hoher Euterassoziation gefunden werden. Durch die negativen Ergebnisse der Umgebungsuntersuchungen scheint das Hauptreservoir dieses Erregers im Euter zu liegen und nicht in der Umwelt.

5.1.1 Phänotypische Verfahren

Insgesamt konnten bei der phänotypischen Identifizierung nach Durchführung eines Röhren-

Koagulase-Tests nach KLOOS (1980) 226 *S. aureus*-Isolate aus VAG nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft ist mit Ausnahme von einzelnen Stämmen von *S. hyicus*, *S. intermedius* und *S. delphini* charakteristisch für *S. aureus*.

Durch den Vergleich der beiden Ausstrichverfahren mit einer erhöhten Milchmenge konnte im Vergleich zur Methode nach DVG (s. 3.5) die Sensitivität der *S. aureus*-Nachweise erhöht werden. Dies bezog sich allerdings nur auf die Nachweise aus Vierteln mit niedrigem SCC. Zusätzliche latente Infektionen konnten mittels der beiden neu angewandten Verfahren nicht nachgewiesen werden. Insbesondere der Nachweis von mehr als einer Bakterienspezies in den Methoden B und C zeigt, dass eine Sensitivitätssteigerung erreicht werden kann. Allerdings bleibt die klinische Bedeutung der nachgewiesenen Keime fraglich. Insbesondere dann, wenn der SCC des betroffenen Viertels nicht erhöht ist.

Da in dem Betrieb eine *S. aureus*-Sanierung auf Bestandsebene durchgeführt wurde, war eine Erhöhung der Sensitivität der zytobakteriologischen Untersuchung nach den Leitlinien des Sachverständigenausschusses der DVG (2009) nicht notwendig.

5.1.2 genotypische Verfahren

Bei der genotypischen Identifizierung konnten sich bei 218 Isolaten die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung durch die PCR zum Nachweis des speziesspezifischen Genabschnitts der Thermonuklease bestätigen. Dieser Genabschnitt wird auch in anderen Studien in der Literatur als speziesspezifische Bestätigung der konventionellen, bakteriologischen Untersuchung herangezogen und liefert laut Autoren zuverlässige Ergebnisse (BRAKSTADT et al. 1992, EISSA 2007).

Die 218 Isolate reagierten ebenfalls in den übrigen durchgeführten PCR-Verfahren (Protein A-Xr-Region, Protein A-IgG-bindende Region und Koagulasegen) mit positivem Ergebnis.

5.2 S. aureus-Differenzierung

Mittels **PCR** konnten sechs verschiedene „PCR-Typen“ erkannt werden (s. Tabelle 4.3: Zusammenfassung der PCR-Polymorphismen). Auch in der Literatur wurden diese Polymorphismen bereits zur genotypischen Differenzierung herangezogen (MÜLLER 1993, FRÉNAVY et al. 1994, AKINEDEN et al. 2001, EISSA 2007). Der Polymorphismus der IgG-bindenden Region des Protein A-Gens ist im Vergleich zu der Xr-Region und des Koagulasegens auch in der Literatur seltener zu finden (AKINEDEN et al. 2001, HASSAN 2002).

Um epidemiologische Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse von Isolaten treffen zu können und damit einen „genetischen Fingerabdruck“ der Bakterien zu erstellen, eignet sich die Pfg. Sie wird als Goldstandard für die Differenzierung von *S. aureus* mit dem höchsten diskriminatorischen Potential bewertet (SCHLICHTING et al. 1993, SHOPSIN et al. 1999, WICHELHAUS et al. 2000, SOMMERHÄUSER et al. 2003). Momentan gibt es keine praktikable Typisierungsmethode, die ein vergleichbares Diskriminierungspotential bietet. Diese starke Diskriminierungsfähigkeit der Restriktionsanalyse konnte auch bei den hier untersuchten Isolaten festgestellt werden. Aus einer Untersuchungsperiode über fast ein Jahr wurden in dem untersuchten Betrieb 80 Isolate mittels Pfg. typisiert. Nach der visuellen Auswertung der Bandenmuster wurden zwei nicht miteinander verwandte Stämme nachgewiesen. Der Pfg.-Typ I mit insgesamt 10 Subtypen wurde bei 78 Isolaten gefunden, und nur zwei Isolate hatten das Restriktionsmuster des Pfg.-Typs II. Das Tier, von dem diese Isolate stammten, war während des Untersuchungszeitraums zugekauft worden.

Es handelt es sich bei dem Pfg.-Typ I inkl. Subtypen um einen epidemischen *S. aureus*- Stamm, der offensichtlich streng euterassoziiert ist. Dafür sprechen die *S. aureus*-negativen Ergebnisse sämtlicher Umweltproben aus dem Bestand.

Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur mehrfach beschriebenen Erkenntnissen, dass in einem Betrieb ein Pfg.-Typ vorherrscht, es sich somit um ein kontagiöses Infektionsgeschehen handelt, sofern es sich um einen stark ans Euter assoziierten *S. aureus*-Stamm handelt (AKINEDEN et al. 2001, SOMMERHÄUSER et al. 2003). Sofern es sich nämlich um einen nach EISSA (2007) „sporadischen“ *S. aureus*- Stamm handelte, der sich einem Umwelterreger ähnlich verhält, könne man regelmäßig mehrere nicht miteinander verwandte Stämme innerhalb eines Betriebes nachweisen (HAVERI et al. 2008).

Die Dendrogrammanalyse ergab eine Übereinstimmung der untersuchten Stämme bis mindestens 85%. Bei 79 Isolaten (außer Pfg.-Typ Ic) lag die Übereinstimmung sogar bei mindestens 91%. Innerhalb des Dendrogramms wurden die beiden Isolate des Pfg.-Typs II als bis zu 100% identisch mit Subtypen des Pfg.-Typs I identifiziert. Dies zeigt, dass die Auswertung des Dendrogramms nicht zwingend mit der visuellen Auswertung übereinstimmen muss. Dies bestätigten auch FERRIS et al. (2004), die in einer Studie 43 identische Isolate mittels Dendrogrammanalyse miteinander verglichen. Dabei ergab sich z.T. eine Übereinstimmung von 92-93%. Damit wird deutlich, dass die Interpretation der Pfg. allein aufgrund der visuellen

Auswertung als subjektiv zu bewerten ist, was auch schon bei TENOVER et al. (1994) und SHOPSIN et al. (1999) als Kritikpunkt der Pfgc angemerkt wurde.

Neben diesem deutlichen Nachteil der Pfgc sind auch der hohe Zeit- und Arbeitsaufwand weitere Kritikpunkte an dieser Methode. Ein weiteres Problem ergibt sich durch die mangelhafte Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen aus unterschiedlichen Laboren (VAN BELKUM et al. 1998, SHOPSIN et al. 1999). Dies wäre allerdings notwendig, um zuverlässige Aussagen bzgl. der epidemiologischen Zusammenhänge zuzulassen, sofern die Untersuchungen nicht alle in einem Labor durchgeführt werden können (VAN BELKUM et al. 1998).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der ***spa*-Typisierung** vergleichend angewandt. Wie bereits bei SHOPSIN et al. (1999) erwähnt, ist das Diskriminierungspotential dieser Methode nicht vollständig mit der Pfgc vergleichbar, da Subtypen mittels Pfgc besser nachgewiesen werden können. Dieses Ergebnis lässt sich auch anhand der in dieser Studie untersuchten Isolate bestätigen. Es konnte bei den 12 in der Pfgc unterschiedlichen Isolaten nur zwei *spa*-Typen gefunden werden. Ergebnisse bei SHOPSIN et al. (1999) und SAID et al. (2010) zeigten ebenfalls eine höhere Diskriminierungsfähigkeit der Pfgc gegenüber der *spa*-Typisierung. Es wurden allerdings in den Studien bei 62% der Isolate (SHOPSIN et al. 1999) und 46% (SAID et al. 2010) identische *spa*-Typen zu nicht verwandten Pfgc-Typen zugeordnet. In einer Untersuchung von 96 MRSA-Isolaten aus einem Hamburger Klinikum wurden demgegenüber mehr *spa*-Typen (n=18) als Pfgc-Typen (n=16) gefunden. Auch hier wurden z.T. innerhalb eines Pfgc-Musters unterschiedliche *spa*-Typen nachgewiesen, z.T. aber auch identische *spa*-Typen nicht-verwandten Pfgc-Typen zugeordnet. Die Autorin begründet diese Varianz der *spa*-Typen durch Deletionen, Insertionen, Punktmutationen und Duplikationen bzw. durch Verluste von repeats (SCHERPE 2008). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von KOREEN et al. (2004) beschrieben.

Obwohl bei den Isolaten aus dem in dieser Arbeit untersuchten Bestand genetische Veränderungen nach der Auswertung der Restriktionsmuster feststellbar waren, fanden diese offensichtlich nicht im Genom der Xr-Region des *spa*-Gens statt.

Die Diskriminierungsfähigkeit mittels *spa*-Typisierung bei den hier untersuchten gemäß Pfgc-Ergebnis sehr nah verwandten Stämmen erreichte somit nicht die der Pfgc.

Möglich ist eine Kombination der Ergebnisse dieser beiden Methoden. Dies wird in der Literatur

zur möglichst exakten Differenzierung auch empfohlen (SHOPSIN et al. 1999, SCHERPE. 2008, SAID et al. 2010).

Bei der Kombination der Methoden (inkl. des Polymorphismus nach der PCR) ergibt sich auch im Fall des hier beprobten Bestandes die höchste Diskriminierungsfähigkeit (s. Tab. 4.1). Damit ergeben sich insgesamt 13 unterscheidbare Typen.

Zur Beantwortung der Frage, ob und, wenn ja, welche *S. aureus*-Stämme in bestimmten Regionen als Verursacher boviner Mastitiden vorherrschen, sollte die Methode möglichst folgende Eigenschaften besitzen:

- praktikabel und kostengünstig
- hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch bei Bearbeitung in verschiedenen Laboren
- Möglichkeit, Ergebnisse aus unterschiedlichen Untersuchungseinrichtungen zu vergleichen
- Sammlung der Ergebnisse in einer zentralen Datenbank

Diese Eigenschaften inkl. eines vergleichsweise hohen Diskriminierungspotentials vereint die Methode der *spa*-Typisierung.

In verschiedenen Untersuchungen wurden bereits Isolate boviner Mastitiden aus unterschiedlichen Regionen typisiert. KAPUR et al. (1995) untersuchten mittels MLEE 397 weltweit isolierte *S. aureus*-Stämme und konnten feststellen, dass 90% der Isolate acht vorherrschenden Genotypen zuzuordnen waren. Auch FITZGERALD (1997) identifizierte mittels RAPD-PCR, Ribotypisierung (RFLP) und MLEE sowohl in den USA als auch in Irland einen Typ, der bei bovinen Proben dominiert. Auch in einer Studie aus Kanada konnten bestimmte Typen boviner Isolate nach Pflge regional gehäuft nachgewiesen werden (SAID et al. 2010). Hier wurden 87 Isolate aus 24 Betrieben in verschiedenen Regionen Kanadas untersucht, davon gehörten 48,3% zu Typ A und 43,7% zu Typ D. Die genannten Autoren gehen davon aus, dass es bestimmte Typen gibt, die für einen Großteil der bovinen Mastitiden verantwortlich sind.

Nach dem Muster der Datenbank für MRSA (z.B.: EpiMRSA auf <http://www.ridom.de/epimrsa/overview/de/index.shtml>) könnte das Ziel die Erstellung einer Datenbank speziell für bovine *S. aureus*-Stämme sein. Damit stünde ein Werkzeug zur Verfügung, epidemische *S. aureus*-Stämme zu identifizieren. Dies wäre nicht nur für die Impfstoffentwicklung oder für epidemiologische Fragestellungen ein Erkenntnisgewinn. Vielmehr könnten gezielte Untersuchungen z.B. bzgl. der Virulenzfaktor-Ausstattung

durchgeführt werden, um Unterschiede zwischen eher sporadisch auftretenden bzw. epidemischen *S. aureus*- Stämmen zu erkennen.

Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit 92 Isolate aus weiteren hessischen *S. aureus*-Problembetrieben einer *spa*-Typisierung unterzogen. Es wurden 28 verschiedene *spa*-Typen nachgewiesen.

Die Ergebnisse nach BURP-Analyse zeigen das Vorherrschen eines Clonal Complexes (CC543). Verteilt über das hessische Landesgebiet konnten 57 Isolate dieses CC gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass es bestimmte *S. aureus*-Stämme gibt, die für bovine Mastitiden verantwortlich sind. Dies bestätigt auch die Ergebnisse von KAPUR et al. (1995), FITZGERALD et al. (1997) und SAID et al. (2010), die mittels anderer Diskriminierungsverfahren identische Stämme aus bovinen Mastitiden in verschiedenen Regionen finden konnten. Der in dem Sanierungsbetrieb vorherrschende *spa*-Typ t2067 konnte durch den Algorithmus nicht dem CC543 zugeordnet werden. Dies lässt vermuten, dass unterschiedliche *S. aureus*-Stämme für Mastitisgeschehen in Milcherzeugerbetrieben verantwortlich sind.

Die Frage nach den Unterschieden zwischen den Isolaten des CC543 und den weiteren Isolaten, insbesondere auch der Isolate des *spa*-Typs t2067 aus dem Sanierungsbetrieb, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bearbeitet werden. Allerdings sollte diese Fragestellung Ansatz für weitere Arbeiten im Rahmen der *S. aureus*-Forschung und -Bekämpfung insbesondere im Hinblick auf Alternativen zu chemotherapeutischen Behandlungsmethoden und Impfstoffentwicklungen sein.

5.3 Schlussfolgerung für den Gesamtbestand

Zu Beginn der Sanierungsmaßnahme im September 2007 lag die *S. aureus*-Prävalenz in dem hier untersuchten Bestand bei 30% auf Einzeltierebene und bei 12% auf Euterviertelebene.

Damit lag die Prävalenz deutlich über dem hessischen Durchschnitt. Im LHL betrug der Anteil an *S. aureus*-Nachweisen aus VAG im Jahr 2007 3,24%. Somit handelt es sich nach der Definition von ROBERSON et al. (1994) um einen Betrieb mit hoher *S. aureus*-Herdenprävalenz.

Die starke Ausbreitung innerhalb des Betriebes konnte auf die Umstellung des Zitzendesinfektionsmittels auf ein Zitzenpflegemittel zurückgeführt werden. Diese Umstellung

erfolgte Anfang 2007. Voraussichtlich dadurch war die Prävalenz bis September 2007 auf den o.g. Wert angestiegen.

Die Erstellung eines Sanierungskonzeptes beinhaltete den Fünf-Punkte-Plan (HILLERTON et al. 1995, SEARS et al. 2003) und die konsequente Einhaltung der zwei getrennt gehaltenen und gemolkenen Gruppen (*S. aureus*-positiv und -negativ). Ein Tier, das in die positive Gruppe aufgenommen wurde, konnte nicht mehr in die Gruppe der *S. aureus*-negativen Tiere zurückwechseln, auch dann nicht, wenn *S. aureus* später nicht mehr nachgewiesen wurde. Damit wurde verhindert, dass durch intermittierende Ausscheidung nicht nachgewiesene, aber vorhandene Bakterien wieder in die Gruppe der *S. aureus*-negativen Tiere gelangten. Zusätzlich wurden epidemiologische Untersuchungen durchgeführt (s. 5.1 und 5.2). Auch bei SOMMERHÄUSER (2000) wurde der Fünf-Punkte-Plan zur Sanierung *S. aureus*-positiver Betriebe z.T. erfolgreich angewendet, wobei die Punkte „Merzen chronisch kranker Tiere“ und „antibiotische Therapie zum Trockenstellen“ besondere Berücksichtigung fanden. Insbesondere das Merzen wird auch von anderen Autoren als besonders wichtige Maßnahme betont (BRAMLEY und DODD 1984, HILLERTON et al. 1995). In den bei SOMMERHÄUSER (2000) untersuchten Betrieben war der Erfolg der klassischen Sanierung dann am größten, wenn die Maßnahmen „lückenlos und konsequent“ durchgeführt wurden. Des Weiteren war der Erfolg in Betrieben, in denen mehrere genetisch nicht verwandte Isolate nachgewiesen wurden, geringer. Wie bei EISSA (2007) beschrieben, können „epidemische“ und „sporadische“ *S. aureus*-Isolate in Betrieben charakterisiert werden.

Die aus dem hier untersuchten Betrieb durchgeführte molekularbiologische Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate und die Umgebungsuntersuchungen sprechen für einen vorherrschenden epidemischen Stamm, der - wie anschaulich gezeigt wurde - durch die klassische Sanierung erfolgreich bekämpft werden konnte. Diese Sanierung wurde „lückenlos und konsequent“ angewendet.

So wurden im Laufe der Untersuchungsperiode alle chronisch kranken Tiere gemerzt, es wurde zum Trockenstellen unter antibiotischem Schutz ein Cloxacillin-Präparat eingesetzt, als Zitzendesinfektionsmittel wurde ein vom BVL zugelassenes Mittel verwendet, die Melkhygiene wurde angemessen durchgeführt und klinische Mastitiden während der Laktation wurden mit Antibiotika nach Resistenztestung behandelt.

Zusätzlich zu dem vorherrschenden *S. aureus*- Stamm konnte bei einer einzelnen Kuh ein nach der visuellen Pflege-Auswertung nicht verwandter Stamm nachgewiesen werden. Dieses Isolat war auch einem anderen *spa*-Typ zuzuordnen. Bei diesem Tier handelte es sich um ein Zukaufstier, das vor der Einstellung nicht zytobakteriologisch untersucht worden war. Es ist davon auszugehen, dass dieses Tier intramammär mit *S. aureus* infiziert war. Nach Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse kann festgestellt werden, dass eine Infektion in dem „neuen“ Betrieb unwahrscheinlich ist. Diese Beobachtung zeigt, dass der Fünf-Punkte-Plan um den Punkt „zytobakteriologische Untersuchung von Zukaufstieren möglichst vor Einstellung in den Betrieb“ erweitert werden sollte, um Neueinträge von *S. aureus* zu vermeiden.

Nach einer Untersuchungs- und Sanierungsperiode von ca. 15 Monaten lag die *S. aureus*-Prävalenz bei 0,94% auf Einzeltierebene und bei 0,24% auf Euterviertelebene. Nach Ablauf der intensiven Untersuchungsperiode wurde der Betrieb anschließend über einen Zeitraum von 12 Monaten regelmäßig mittels VAG zytobakteriologisch untersucht, und es konnten keine *S. aureus*-positiven Viertel/Tiere mehr gefunden werden.

Der Sanierungsplan, der die klassischen Sanierungsmaßnahmen nach dem Fünf-Punkte-Plan beinhaltete, wurde also erfolgreich angewandt und die *S. aureus*-Prävalenz konnte kontinuierlich von 30% auf 0% gesenkt werden. Damit bleibt die klassische Sanierung bei epidemischen *S. aureus*-„Ausbrüchen“ in Milchviehbeständen nach wie vor eine wirksame Maßnahme.

6 Zusammenfassung

Claudia Sauerwald

Die subklinische *Staphylococcus aureus*-Mastitis – Sanierung eines hessischen Milcherzeugerbetrieb und epidemiologische Untersuchungen mittels Staphylokokken-Protein-A (*spa*)-Typisierung

Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

84 S., 14. Abb., 12 Tab., 135 Lit., Anhang mit einer Tab.

Eingereicht im 2013

Schlüsselwörter: Milchkuh, subklinische Mastitis, *Staphylococcus aureus*, Bestandssanierung, Pflege, *spa*-Typisierung

In der vorliegenden Studie wurde die Sanierung einer durch *S. aureus* verursachten Eutergesundheitsstörung in einem hessischen Milchviehbestand mittels klassischer Sanierungsmaßnahmen über einen Zeitraum von 18 Monaten begleitet.

Durch konsequente Einhaltung der Sanierungsmaßnahmen nach dem Fünf-Punkte-Plan und die räumliche Trennung der Herde in eine *S. aureus*-positive und -negative Gruppe sank die *S. aureus*-Prävalenz im Betrieb innerhalb von 15 Monaten von 30% auf <1%. Nach 18 Monaten waren erstmalig keine Neuinfektionen mehr mit *S. aureus* zu verzeichnen.

Zusätzlich zu den im Abstand von drei Monaten durchgeführten Viertelanfangsgemelk (VAG)-Gesamtbestandsuntersuchungen wurden Umweltproben bakteriologisch auf das Vorhandensein von *S. aureus* untersucht. Diese Untersuchungen verliefen ausschließlich mit negativem Ergebnis.

Die im Untersuchungszeitraum asservierten 218 *S. aureus*-Isolate aus diesem Betrieb wurden genotypisch mittels PCR untersucht. Thermonuklease-Gen, Protein A-Gen (IgG-bindende

Region) und Polymorphismen bei Protein A-Gen (Xr-Region) sowie Koagulase-Gen ermöglichten die Unterscheidung in sechs Typen.

Zusätzlich wurden 80 dieser Isolate mittels Pulsfeldgelelektrophorese (Pfge, Gold Standard) typisiert. Es konnten zwei Pfge-Typen gefunden werden: Pfge-Typ I mit insgesamt 10 Subtypen (bei 78 Isolaten) und Pfge-Typ II (bei zwei Isolaten). Der Pfge-Typ II wurde ausschließlich bei einem Zukaufstier nachgewiesen, das vor der Einstallung in diesen Betrieb nicht zytobakteriologisch untersucht worden war.

Die 12 unterschiedlichen Pfge-Typen bzw. -Subtypen wurden zusätzlich mittels Staphylokokken-Protein A- (*spa*)-Typisierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle Subtypen des Pfge-Typs I dem *spa*-Typ t2067 zugeordnet werden konnten und der Pfge-Typ II dem *spa*-Typ t2112 entsprach.

92 weitere bovine *S. aureus*-Mastitisisolate wurden möglichst randomisiert über das Landesgebiet Hessens entnommen und mittels dieser Typisierungsmethode untersucht. Die Isolate stammten ebenfalls aus *S. aureus*-Problembetrieben und wurden aus VAG von (sub-) klinischen Mastitiden in Reinkultur isoliert. Insgesamt konnten 28 *spa*-Typen unterschieden werden. Durch den Algorithmus BURP wurden 57 dieser Isolate dem Clonal Complex CC543 zugeordnet und waren demnach genetisch eng miteinander verwandt. Der in dem Sanierungsbetrieb vorherrschende *spa*-Typ t2067 war dem CC543 nicht zuzuordnen.

Die Anwendung der *spa*-Typisierung in der Routinediagnostik und damit die Möglichkeit der laborübergreifenden, möglichst zentralisierten Datendokumentation der Ergebnisse könnten zukünftig die Identifizierung besonders häufig vorkommender und damit hochkontagiöser *S. aureus*-Stämme ermöglichen.

7 Summary

Claudia Sauerwald

Mastitis caused by *Staphylococcus aureus* - Redevelopment of an infected dairy herd in Hesse and epidemiological investigations using staphylococcal-protein A (*spa*)-typing

Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted 2013

84 p., 14. fig., 12 tables, 135 ref., app. with 1 table.

Key words: dairy cow, subclinical mastitis, *Staphylococcus aureus*, redevelopment, Pfgc, *spa*-typing

In the present study a dairy herd with mastitis problems caused by *S. aureus* was observed for 18 months while taking actions against the high *S. aureus*-prevalence of subclinical intramammary infections using the classical measures of redevelopment.

The prevalence of *S. aureus* in the herd declined during 15 months from 30% to <1% because the 5-point-plan and the division of the herd into a *S. aureus*-positive and -negative group were kept very consistently. After 18 months no more new infections were observed.

The bacteriological *S. aureus*- status of the herd was controlled every three months by quarter milk samples of all lactating cows. Environmental bacteriological testing was also performed, but all samples gave negative *S. aureus* results.

During the observation period 218 *S. aureus*- isolates were preserved and also investigated by PCR. On the basis of polymorphisms in the protein-A-gene and the coagulase-gene six types could be differentiated.

Furthermore 80 of these isolates were typed using pulsed-field-gel-electrophoresis (pfge, gold standard). Two different pfge-types: pfge-type I with 10 subtypes (78 isolates) and pfge-type II

(two isolates) could be found. The second type was found in only one cow that had been acquired from another herd.

The 12 different pfge-types and -subtypes were investigated by staphylococcal protein A (*spa*)-typing. All isolates of the pfge-type I matched to the *spa*-type t2067 and the pfge-type II was in accordance to *spa*-type t2112.

With this typing-method 92 different bovine *S. aureus*- isolates from Hesse were investigated, too. These strains originating from (sub-) clinical mastitis were isolated from *S. aureus*-dairy herds that were randomized throughout the state of Hesse. Altogether 28 different *spa*-types could be found. Using the algorithm BURP, 57 isolates could be assigned to the clonal complex CC543 and were genetically closely related. The *spa*-type that could be found most frequently in the dairy herd mentioned above could not be matched to CC543.

The utilization of *spa*-typing in the daily routine and the possibility to compare these results between different laboratories may allow for the identification of highly prevalent *S. aureus*-strains which are therefore highly contagious.

8 Literaturverzeichnis

Aarestrup FM, Andersen JK, Jensen NE. Lack of staphylococcal enterotoxin production among strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Denmark. *Acta Vet Scand.* 1995;36:273-5.

ADR (Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V.). ADR-Rinderproduktion Ausgabe 2012. 2011.

Akineden Ö, Annemüller C, Hassan AA, Lämmle C, Wolter W, Zschöck M. Toxin Genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:959-64.

Anderson JC. Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunisation and therapy. *Vet Rec.* 1982;110:372-6.

Anderson KL, Lyman RL, Bodeis-Jones SM, White DG. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. *Am J Vet Res.* 2006;67:1185-91.

BTK und AGTAM. Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln. 2010 (zitiert 14.04.2013):1-24.

<http://www.bundestieraerztekammer.de/downloads/btk/leitlinien/Antibiotika-Leitlinien_2010.pdf>.

Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2000;61:1-10.

Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The role of cow, pathogen and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 2006;89:1877–95.

Bjerketorp J. Novel adhesive proteins of pathogenic staphylococci and their interactions with host protein [Dissertation med. vet]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2004.

Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun.* 2001;69:345-52.

Boynukara B., Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K, Solmaz H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int J Food Microbiol.* 2008;125(2):209-1.

Brakstadt OD, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of nuc gene. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1654-60.

Bramley AJ, Dodd FH. Reviews of the progress in dairy science: Mastitis control - progress and prospects. *J Dairy Res.* 1984;51:481-512.

Brückler J, Klima H, Schaeg W, Manz D, Blobel H. *Staphylococcus aureus* von Kühen mit

subklinischen Euterinfektionen. Zbl Vet Med B. 1981;494-9.

Calzolari A, Giraudo JA, Rampone H, Odierno L, Giraudo AT, Friferio C, Bettera S, Raspanti C, Hernandez J. Field trial of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. J Dairy Sci. 1997;80:854-8.

Coenen C. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Risikoeinschätzung pathogener Keime in Rohmilch und Rohmilchprodukten aus der Direktvermarktung [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie-Universität Berlin; 2000.

Dego OK, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. Vet Quart. 2002;24(4):181-98.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Reviews. 2000;13:16-34.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Fachgruppe „Milchhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.). Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. 3. Aufl. Gießen: DVG; 1994.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Fachgruppe "Milchhygiene des Sachverständigenausschusses 'Subklinische Mastitis'"). Leitlinien Entnahme von Milchproben unter aseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. 2. Aufl. Gießen: DVG; 2009.

Edinger D. Peripartale Mastitiden bei Erstkalbinnen - Untersuchungen zu Ätiologie und Prophylaxe sowie zu Auswirkungen auf Gesundheit und Leistungsfähigkeit [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2001.

Eissa NMB. Molekularbiologischer Nachweis mutmaßlicher Virulenzfaktoren bei Staphylococcus aureus- Kulturen isoliert von Rindermastitiden [Dissertation med. vet]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2007.

Elek SD, Levy E. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. J Pathol Bacteriol. 1950;62:541-54.

Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 2000;38:1008-1115.

Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J Dairy Sci. 2002;85:1111-8.

Erskine RJ, Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Spencer SB, Campbell MA. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. J Am Vet Med Assoc. 1988;192:761-765.

Ferris M, Yan X, Habbersett R, Shou Y, Lemanski C, Jett J, Yoshida T, Marrone B. Performance assessment of DNA fragment sizing by high-sensitivity flow cytometry and pulsed-field-gel-electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):1965-76.

Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V. Fine-structure epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect.* 1997;119:261-9.

Forsgren A. Significance of protein A production by staphylococci. *Infect Immun.* 1970;2:672-3.

Foster G, Ross M, Hutson RA, Collins MD. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:724-30.

Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, Leeuwen CM, Grauls JEV, Verhoef J, Mooi FR. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15:60-4.

Frénay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Van Leeuwen WJ, Mooi FR. Discrimination of epidemic and non-epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1994;32:846-7.

Friton G.M. Untersuchung zum Erfolg verschiedener Behandlungsformen bei laktierenden Kühen mit subklinischer Mastitis. [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1998.

Gedek B, Kaaden OR, Mahnel H, Mayr A. Grampositive Bakterien. In: Mayr A, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 6. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke; 1993a. p.688-98.

Gedek B, Kaaden OR, Mahnel H, Mayr A. Bekämpfung der Infektionskrankheiten der Tiere. In: Mayr A, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 6. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke; 1993b. p. 108-21.

Giraud JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraud AT, Bogni C, Larriestra A, Nagel R. Field trial of a vaccine against bovine mastitis. 1. evaluation in heifers. *J Dairy Sci.* 1997;80:845-53.

Gregory L. Die katarrhalische Mastitis des Rindes: Häufigkeit, Ätiologie und Therapie-Statistische Erhebungen an einer Hochschulklinik in den Jahren 1986-1996. [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1999.

Hájek V, Maršálek E. Evaluation of classificatory criteria for *Staphylococci*. *Zbl Bakt I Abt Suppl* 5. 1976:11-21

Hájek V, Maršálek E. The differentiation of pathogenic *Staphylococci* and a suggestion for their taxonomic classification. *Zbl Bakt I Abt Orig.* 1971:176-82.

Hájek V, Maršálek E. The occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in hosts of different animal species. *Zbl Bakt I Abt Orig A.* 1973;223:63-8.

Hamann J. Mastitisbekämpfung auf der Grundlage zytologischer Befunde der Herdensammelmilch. Kieler milchwirtsch Forschungsbericht 44. 1992:327-338.

Hamann J, Grunert E. Ökonomie der Mastitisbekämpfung - eine diagnostische Frage? Prakt Tierarzt. 1998;coll vet XXVIII:62-70.

Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J Dairy Sci. 1994;77:2103-12.

Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5442-8.

Hassan AA. Nachweis und weitergehende Analyse von speziesspezifischen Genabschnitten zur molekularen Charakterisierung einiger Mastitiserreger vom Rind. [Dissertation med. vet]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2002.

Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Ogawa T, Endo T, Eguchi M. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Hokkaido, Japan. J Vet Med Sci. 2006;68(2):165-70.

Haveri M, Hovinen M, Roslöf A, Pyörälä S. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. J Clin Microbiol. 2008;46:3728-35.

Hillerton JE, Bramley AJ, Starker RT, McKinnon CH. Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. J Dairy Res. 1995;62:39-50.

Hoedemaker M, Korff B, Edler B, Emmert M, Bleckmann E. Dynamics of *Staphylococcus aureus* infections during vaccination with an autogenous bacterin in dairy cattle. J Vet Med. 2001b;48:373-83.

Hoedemaker M. Neuere Aspekte zur Bekämpfung von *Staphylococcus aureus* als Mastitiserreger. Tierärztl Praxis. 2001a;29:1-7.

Hoefnagels-Schuermans A, Peetermans WE, Struelens MJ, van Lierde S, van Eldere J. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol. 1997;35:2514-20.

Hoffmann H. Impfstoffe und Impfstoffherstellung. In: Blobel H, Schließer T, Hrsg. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band I. 2. Aufl. Jena: Gustav Fischer; 1991. S.423-511.

Hogan JS, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Rate of environmental mastitis in quarters infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species. J. Dairy Sci. 1988;71:2520-25.

Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1083-9.

Hughes J. Bedding systems and mastitis. *Proceedings of the British Mastitis Conference.* Stoneleigh, UK. 1999:73-8.

Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29:426-30.

Kapur V, Sisco W, Greer R, Whittam T, Musser J. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol.* 1995;33(2):376-80.

Kasche S. Pathogenese und Therapie der Staphylokokkenmastitis des Rindes. [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1995.

Kenny K, Reiser RF, Bastida-Corcuera FD, Norcross NL. Productions of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1993;31:706-7.

Kirk J.H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. Part 1: *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. *Agri Pract.* 1991;12:5-8.

Kloos WE. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol.* 1980;34:559-92.

Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss E, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. Spa-typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):792-9.

Köster G. Einflüsse auf die Eutergesundheit und Verbreitung von Mastitiserregern sowie deren Resistenzlage in Brandenburger Milchviehbetrieben. [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Universität; 2005.

Krömker V, Hamann J. Nichtantibiotische Mastitistherapie - Einordnung und Beurteilung *Prakt Tierarzt.* 1999;80:48-51.

Lee JH. Methicillin (oxacillin) -resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Envir Microbiol.* 2003;69:6489-94.

Lee PK, Deringer JR, Kreiswirth BN, Novick RP, Schlievert PM. Fluid replacement protection of rabbits challenged subcutaneously with toxic shock syndromes toxins. *Infect Immun.* 1991;89:879-84.

Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 2003;95:38-43.

Malinowski E. The use of some immunomodulators and non-antibiotic drugs in a prophylaxis and treatment of mastitis. *Pol J Vet Sci.* 2002;5(3):197-202.

Martin G, Bergmann A. Untersuchung über eine routinemäßige Methode des Nachweises von Staphylokokkenhämolysinen. *Mh Vet Med.* 1994;49:187-94.

Matsunaga T, Kamata S, Kakiichi N, Uchida K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci.* 1993;55:297-300.

Matthews KR, Harmon RJ, Langlois BE. Effect of naturally occurring coagulase-negative-Staphylococci infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine. *J Dairy Sci.* 1991;74:1855-59.

McDougall S. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *N Z Vet J.* 1998;46:226-32.

Meyer W. Differenzierungsschema für Standortvarianten von *Staphylococcus aureus*. *Zbl Bakt I Abt Orig.* 1966:465-81.

Middleton J.R. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2008;7(6):805-15.

Milch-Güteverordnung (MilchGüV) vom 9. Juli 1980 (BGBl. I S. 878, 1081), zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 17. Dezember 2010 (BGBl. I S. 2132) geändert. 1980.

Moodley A, Stegger M, Bagcigil AF, Baptiste KE, Loeffler A, Lloyd DH, Williams NJ, Leonard N, Abbott Y, Skov R, Guardabassi L. Spa-typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *J Antimicrobiol Chemotherapy.* 2006;58:1118-23.

Müller C. Charakterisierung von Staphylokokken aus Mastitismilchproben der Region Nordostschweiz. [Dissertation med. vet]. Zürich: Univ. Zürich; 1993.

Müller HP, Litke MO, Blobel H. Protein A - Aktivität von Staphylokokken unterschiedlicher tierartlicher Herkunft mit Immunglobulin G von Haus- und Versuchstieren, sowie vom Menschen. *Zbl Vet Med.* 1983:305-12.

Muraille E, de Smedt T, Andris F, Pajal B, Armant M, Urbain J, Moser M, Leo O. Staphylococcal enterotoxin B induces an early and transient state of immunosuppression characterized by V-beta unrestricted T cell unresponsiveness and defective antigen-presenting cell functions. *J Immunol.* 1997;158:2638-47.

Natzke RP, Everett RW, Postle DS. Normal milk somatic cell counts. *J Milk Food Techn.* 1972;35:261-3.

Nilsson H, Bjork P, Dohlsten M, Antonsson P. Staphylococcal enterotoxin H displays an unique MHC II-binding properties. *J Immunol.* 1999;163:6686-93.

Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. J Dairy Sci. 1994a;77:1267-75.

Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody response. J Dairy Sci. 1994b;77:1276-84.

Omoe K, Hu D, Nakane A, Shinagawa K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect Immun. 2003;71:6088-94.

Orden JA, Goyache J, Hernandez J, Domenech A, Suarez G, Gomez-Lucia E. Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis: comparison of ELISA and immunoblot. J Appl Bacteriol. 1992;72:486-9.

Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DYM, Gutierrez JA, Bohach GA, Schlievert PM. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. Infect Immun. 2003;71:2916-9.

Osteras O, Edge VL, Martin SW. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. J Dairy Sci. 1999;82:1221-31.

Owens WE, Watts JL, Boddie RL, Nickerson SC. Antibiotic treatment of mastitis: Comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies. J Dairy Sci. 1988;71:3143-7.

Peerschke EI, Bayer AS, Ghebrehiwet B, Xiong YQ. GC1qR/p33 blockade reduces *Staphylococcus aureus* colonization of target tissues in an animal model of infective endocarditis. Infect Immun. 2006;74:4418-23.

Perez MM, Prenafeta A, Valle J, Penadés J, Rota C, Solano C, Marco J, Grilló MJ, Lasa I, Irache JM, Maira-Litran T, Jiminéz-Barbero J, Costa L, Pier GB, de Andrés D, Amorena B. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β -1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. Vaccine. 2009;27:2379-86.

Petersson-Wolfe CS, Mullarky IK, Jones GM. *Staphylococcus aureus* mastitis: Cause, Detection and Control. 2010 (zitiert vom 19.04.2013):1-7, http://pubs.ext.vt.edu/404/404-229/404-229_pdf.pdf.

Poutrel B, Ducelliez M. Evaluation of three rapid tests for identification of *Staphylococcus aureus* in bovine milk. Ann Rech Vet. 1979;10:125-9.

Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I, Costa L. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *S. aureus* induced mastitis. Vet Immunol Immunopathol. 2010;134(3-4):208-17.

Reppel C. Untersuchungen zur Epidemiologie von *Staphylococcus aureus* als Mastitiserreger bei

Kühen und Erstkalbinnen. [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Universität; 2006.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Beser TE. Coagulase-positive *Staphylococcus aureus* intramammary infections in primiparous dairy cows. *J Dairy Sci.* 1994;77:958-69.

Röder R. Beziehungen zwischen Zellgehalt und bakteriologischem Befund von Viertelgemelksproben beim Deutschen Fleckvieh. [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 1985.

Said KB, Ismail J, Campbell J, Mulvey MR, Bourgault A, Messier S, Zhao X. Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus aureus* lineages in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field-gel electrophoresis, and spa-typing. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):375-86.

Scherpe Stefanie. Etablierung der spa-Typisierung zur Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*-Isolaten am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. [Dissertation med.]. Hamburg: Universität Hamburg; 2008.

Schlichting C, Branger C, Fournier JM, Witte W, Boutonnier A, Wolz C, Goullet P, Doring G. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. *J Clin Microbiol.* 1993;31:227-32.

Schukken YH, Leslie KE, Barnum DA, Mallard BA, Lumsden JH, Dick PC, Vessie GH, Kehrli ME. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infections. *J Dairy Sci.* 1999;82:2393-401.

Schulz J. Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Stuttgart: Gustav Fischer; 1994. P.226-94

Sears PM, McCarthy KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim.* 2003;19:171-85.

Seki K, Sakurada J, Seong HK, Murai M, Tachi H, Ishii H, Masuda S. Occurrence of coagulase serotype among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy individuals-special reference to correlation with size of protein-A gene. *Microbiol Immun.* 1998;42:407-9.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M. Evaluation of Protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3556-63.

Slobodníková L, Zahradnikova D, Kotulova I. *Staphylococcus aureus* in chronic and recurrent infections. *Folia Microbiol (Praha).* 1995;40:655-8.

Smith KL, Hogan JS. Environmental Mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1993;9(3):489-98.

Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence,

prevention. J Dairy Sci. 1985;68:1531-53.

Sobiraj A, Kron A, Schollmeyer U, Failing K. Bundesweite Untersuchung zur Erregerverteilung und In-vitro-Resistenz euterpathogener Bakterien in der Milch von Kühen mit subklinischer Mastitis. Tierärztl Prax. 1997;25:108-15.

Sobiraj A, Illing C, Friebel H, Bartel K, Richter A. Heilungsraten bei Kühen mit subklinischer und unspezifischer Mastitis. Tierärztl Umschau - Sonderdruck. 2000;6:315-20.

Sommerhäuser J. Untersuchung mittels Geno- und Phänotypisierung von *S.aureus* als Erreger subklinischer Mastitiden in hessischen Milcherzeugerbetrieben im Zuge von Bestandssanierungsmaßnahmen. [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2000.

Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. Vet Microbiol. 2003;96:91-102.

Strommenger B, Kehrenberg C, Kettlitz C. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. J Antimicrob Chemother. 2006a;57:461-5.

Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to groups by *spa* typing, *Sma*I macrorestriction analysis, and Multilocus Sequence Typing. J Clin Microbiol. 2006b;44:2533-40.

Takeshige K, Watanabe K, Igarashi H, Shingaki M, Terayama T. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and some characteristics with special reference to enterotoxin producibility and coagulase types of isolates. Jpn J Vet Sci. 1983;59:355-62.

Tenhagen BA, Hansen I, Reinicke A, Heuwieser W. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. J Dairy Res. 2009;76(2):179-87.

Tenhagen, Kö G. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J Dairy Sci. 2006;89:2542-51.

Tenover F, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis W, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal L, Miller M, Mulligan M, Pfaller M. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1994;32(2):407-15.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2233-9.

Thomas DY, Jarraud S, Lemerrier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon ML, Lina G, Vandenesch F. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal

superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect Immun. 2006;74(8):4724-34.

Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS, Schoenberger PS. Gram-negative bacterial infections of mammary gland in cows. Am J Vet Res. 1991;52:184-8.

Uehlinger P. Untersuchung über die Effektivität einer zusätzlichen parenteralen Applikation von Antibiotika bei der Behandlung von chronisch- subklinischen Mastitiden. [Dissertation med. vet]. Zürich: Univ. Zürich; 1999.

Van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brian F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, el Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrough H. Assessment of Resolution and Intercenter Reproducibility of Results of Genotyping *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field-Gel Electrophoresis of *Sma*I Makrorestriktion Fragments: a Multicenter Study [Artikel] // J Clin Microbiol. - 1998. - 36 (6). - S. 1653-9.

Vimercati C, Cremonesi P, Castiglioni B, Pisoni G, Boettcher P, Stella A, Vicenzoni G, Moroni P. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats and sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxins genes. J Vet Med B. 2006;53:423-8.

Waage S, Mørk T, Røros A, Aasland D, Hunshamar A, Ødegaard SA. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. J Dairy Sci. 1999;82:712-9.

Walkenhorst M. Vergleich von homöopathischer mit antibiotischer Laktationstherapie zur Behandlung von Mastitiden des Rindes. [Dissertation med. vet]. Zürich: Univ. Zürich; 2006.

Weiss E. Entzündung. In: Stünzi H, Weiss, E, Hrsg. Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. 8. Aufl. Berlin-Hamburg: Paul Parey; 1990.p.230-71.

Weiss E. Weibliche Geschlechtsorgane. In: Dahme E, Weiss E, Hrsg. Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 6. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke; 2007. p. 312-32.

Weiss J, Pabst W, Strack KE, Granz S. Tierproduktion. 12. Aufl. Berlin,Wien: Paul Parey; 2000.p.96-8.

Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V. Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. Chem J. 2000;2:93-8.

Wieler LH, Baljer G. Antibiotika und Resistenzproblematik: hygienische und immunologische Alternativen. Tierärztl Prax. 1999;27:341-7.

Wilson DJ, Gonzalez RN, Case KL, Garrison LL, Gröhn YT. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. J Dairy Sci. 1999;82:1664-70.

Wolter W, Kloppert B, Castaneda H, Zschöck M. Die Mastitis des Rindes - Ein Kursbuch. 2000 (zitiert vom 23.04.2013): 1-46, <<http://bibd.uni-giessen.de/gdoc/2002/uni/p020001.pdf>>.

Wolter W, Kloppert B, Zschöck M. Eutersundheitssituation in Hessischen Milcherzeugerbetrieben. 37. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG. Gamisch-Partenkirchen, Deutschland. Gießen: DVG, 1996.

Wolter W, Kloppert B, Zschöck M, Castaneda H. Stellenwert der zytobakteriologischen Untersuchung von Milchproben im Rahmen der Eutergesundheitsüberwachung. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft: Tagung des Arbeitskreises Eutergesundheit. 2003. Gießen, Deutschland. Gießen: DVG Service, 2003.

Yancey RJ jr. Vaccines and Diagnostic Methods for Bovine Mastitis: Fact and Fiction. Adv Vet Med. 1999;41:257-73.

Yarwood JM, Mc Cormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization an expression analysis of Staphylococcus aureus pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. J Biol Chem. 2002;277:13138-47.

Zehner MM, Farnsworth RJ, Appleman RD, Larnitz K, Springer JA. Growth of environmental mastitis pathogens in various bedding material. J Dairy Sci. 1986;69:1932-41.

Zschöck M, Kloppert B, Wolter W, Hamann HP, Lämmle C. Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. Vet Microbiol. 2005;108:243-9.

Zschöck M, Sommerhäuser J, Castaneda H. Relatedness of Staphylococcus aureus isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in a single herd. J Dairy Res. 2000;67:429-35.

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: DVG-Kategorien der Eutergesundheit.....	2
Tabelle 2.2: Kliniker-Einteilung klinisch inapparenter Eutererkrankungen/Abgrenzung zur Eutergesundheit nach Prof. Dr. A. Sobiraj	4
Tabelle 2.3: Kliniker-Einteilung klinischer Mastitiden nach Prof. Dr. A. Sobiraj	5
Tabelle 2.4: Die genotypischen Typisierungsmethoden beurteilt nach den Primärkriterien; Tab. modifiziert nach Wichelhaus et al. (SCHERPE, 2008).....	17
Tabelle 2.5: Untersuchungsprotokolle zur Feststellung des Therapieerfolges nach WALKENHORST (2006)	28
Tabelle 4.1: Häufigkeit der verschiedenen Amplifikatgrößen des Koagulasegens.....	59
Tabelle 4.2: Häufigkeit der verschiedenen Amplifikatgrößen der Xr-Region des Protein-A-Gens	60
Tabelle 4.3: Zusammenfassung der PCR- Polymorphismen	60
Tabelle 4.4: Verteilung der Pfg-Typen auf Euterviertel- und Tierebene nach visueller Auswertung nach TENOVER et al. (1995).....	62
Tabelle 4.5: Verteilung der <i>spa</i> -Typen bei 92 bovinen <i>S. aureus</i> - Isolatn	68
Tabelle 4.6: Darstellung der Clusteranalyse der gefundenen <i>spa</i> -Typen.....	69
Tabelle 4.7: Zusammenfassung der genotypischen Untersuchungsergebnisse (PCR, Pfg, <i>spa</i> -Typisierung)	71
Tabelle 9.3: Zuordnung der Tiere zu PFGE-Typen und Kodierung im Dendrogramm; Kodierung der Viertel: 1 = vorne rechts, 2= hinten rechts, 3 = vorne links, 4 = hinten links.....	97

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Aufbau des Protein- A- Gens. Die Kästchen symbolisieren einzelne Genabschnitte; S= Signalsequenz, A-D= IgG-bindende Region, E= zu A-D homologe Region, X= X _r (SSR-Region) + X _c (zellwandassoziierte Region). (SHOPSIN, et al., 1999).....	16
Abbildung 3.1: Verteilung der hessischen bovinen <i>S. aureus</i> -Isolate	45
Abbildung 4.1: Ausstrich- Methoden A-C.....	56
Abbildung 4.2: Verteilung der Keimnachweise aufgeteilt nach Keimgruppen; 1= kulturell kein Wachstum (kkW), 2= <i>Corynebacterium</i> sp., 3= KNS; 4= SCÄ, 5= Coliforme Keime, 6= <i>S. aureus</i>	56
Abbildung 4.3: <i>S. aureus</i> -Subkultur nach 24 h (a) - bzw. 48 h (b) Bebrütung bei 37°C	58
Abbildung 4.4: Makrorestriktionsanalyse von acht <i>S.aureus</i> -Kulturen nach Restriktionsverdau mit dem Enzym SmaI; Marker 1 = Lambda Ladder Pfg Marker 50-1000 kB; Marker 2 = Low Range Pfg Marker 0,1-200 kB.....	61
Abbildung 4.5: Verteilung und Nachweise der Pfg-Typen bei den 17 untersuchten Tieren nach visueller Auswertung nach TENOVER et al. (1995)	63
Abbildung 4.6: Nachweise der Pfg-Typen an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten	64
Abbildung 4.7: Dendrogrammanalyse der 80 Restriktionsmuster; Dice (Tol5,0%-5,0%)	65
Abbildung 4.8: Screenshot aus der Datenbank Ridom Spa Server zum <i>spa</i> -Typ t2067	66

Abbildung 4.9: Screenshot aus der Datenbank Ridom Spa Server zum <i>spa</i> -Typ t2112	67
Abbildung 4.10: Darstellung des CC543 nach BURP-Analyse.....	69
Abbildung 4.11: Verteilung der Isolate des CC543; Dreiecke: Isolate des CC543; Kreise: übrige Isolate	70
Abbildung 4.12: Verlauf der <i>S. aureus</i> - Prävalenzen auf Euterviertel- und Einzeltierebene in VAG aus Gesamtbestandsuntersuchungen.....	72

9.3 Zuordnung der Tiere zu Pfge-Typen und Kodierung im Dendrogramm (Tabelle)

Tabelle 9.3: Zuordnung der Tiere zu Pfge-Typen und Kodierung im Dendrogramm; Kodierung der Viertel: 1 = vorne rechts, 2= hinten rechts, 3 = vorne links, 4 = hinten links

Tier	Pfge-Nummer	Untersuchung	Viertel (a = Isolat aus Doppelprobe)	Kodierung für Dendrogramm	Pfge-Typ nach visueller Auswertung
1	1	U3	2	K5-U3_2	I
1	2	U6	2	K5-U6_2	I
1	3	U7	2	K5-U7_2	Ia
1	4	U7	2a	K5-U7_2a	Ia1
2	39	U5	2	K6-U5_2	Ib
2	40	U5	4	K6-U5_4	Ich
2	41	U6	2	K6-U6_2	Ib
2	42	U6	4	K6-U6_4	Ich
2	43	U7	2	K6-U7_2	Ich
2	44	U7	4	K6-U7_4	Ich
2	80	U3	3	K6-U3_3	Ib
3	8	U3	3	K9-U3_3	Ic
3	9	U6	3	K9-U6_3	Id
3	23	U7	2	K9-U7_2	Ib
3	24	U7	3	K9-U7_3	Ia1
4	19	U3	1	K15-U3_1	Id
4	20	U6	1	K15-U6_1	Ia1
4	21	U6	3	K15-U6_3	Id
4	22	U7	1	K15-U7_1	Ia1
5	36	U1	2	K16-U1_2	Ib
5	37	U7	1	K16-U7_1	Ib
5	38	U7	2	K16-U7_2	Ib
6	32	U2	4	K18-U2_4	Ie
6	33	U3	4	K18-U3_4	Ie

6	34	U5	4	K18-U5_4	ld
6	35	U6	4	K18-U6_4	ld
7	29	U2	2	K40-U2_2	l
7	30	U3	2	K40-U3_2	l
7	31	U3	3	K40-U3_3	la1
8	5	U1	3	K42-U1_3	la
8	6	U7	2	K42-U7_2	lb
8	7	U7	3	K42-U7_3	la1
9	53	U7	2	K65-U7_2	lj
9	63	U2	2	K65-U2_2	la1
9	64	U2	4	K65-U2_4	la1
9	65	U3	4	K65-U3_4	la1
9	66	U5	4	K65-U5_4	la1
9	67	U6	4	K65-U6_4	la1
9	68	U6	4a	K65-U6_4a	la
9	69	U6	1	K65-U6_1	ld
9	70	U7	1	K65-U7_1	ld
10	10	U3	1	K74-U3_1	ld
10	11	U5	1	K74-U5_1	ld
10	12	U6	1	K74-U6_1	le
11	54	U2	4	K83-U2_4	lb
11	55	U3	1	K83-U3_1	l
11	56	U4	1	K83-U4_1	l
11	57	U5	4	K83-U5_4	lb
11	58	U6	1	K83-U6_1	l
11	59	U7	1	K83-U7_1	l
12	45	U4	1	K85-U4_1	lf
12	46	U4	2	K85-U4_2	l
12	47	U5	4	K85-U5_4	la1
12	48	U6	4	K85-U6_4	ld
12	60	U3	3	K85-U3_3	la1
12	61	U5	3	K85-U5_3	la1
12	62	U6	3	K85-U6_3	la1
12	79	U2	3	K85-U2_3	ld
13	25	U6	3	K88-U6_3	lg
13	26	U7	3	K88-U7_3	la1
14	49	U6	3	K92-U6_3	la
14	50	U7	1	K92-U7_1	lb

14	51	U7	2	K92-U7_2	lb
14	52	U7	3	K92-U7_3	la1
14	81	U3	3	K92-U3_3	lb
15	18	U2	3	K93-U2_3	la1
15	71	U3	2	K93-U3_2	la1
15	72	U5	2	K93-U5_2	la1
15	73	U6	2	K93-U6_2	la1
15	74	U7	2	K93-U7_2	la1
15	75	U3	3	K93-U3_3	la1
15	76	U5	3	K93-U5_3	la
15	77	U7	3	K93-U7_3	la
16	13	U3	2	K95-U3_2	lf
16	14	U5	2	K95-U5_2	lf
16	15	U5	2a	K95-U5_2a	lf
16	16	U6	2	K95-U6_2	lf
16	17	U6	2a	K95-U6_2a	lf
17	27	U6	2	K119-U6_2	ll
17	28	U7	2	K119-U7_2	ll

9.4 Verwendete Chemikalien und Geräte

Chemikalien

Agarose

- Standard-Agarose
- NuSieve 3:1 Agarose
- Pulsed Field Certified Agarose

Bovines Serum Albumin

Ethidiumbromid Solution 1%

Lysostaphin

Proteinase K

Formaldehydlösung 37%

Bactident® Coagulase

AirlifeTM 0,45%, SodiumCl

D⁽⁺⁾-Glucose-Monohydrat

Biozym, Hessisch Oldendorf

Lonza, Rockland, USA

Bio-Rad, München

Biozol, Eching

Sigma- Aldrich, München

Sigma, München

Qiagen, Hilden

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Cardinal Health, Kleve

Merck, Darmstadt

Lysozym	Merck, Darmstadt
Polymerase	Fermentas, St. Leon- Rot
Smal	Promega, Mannheim
dNTP`s	Biozym, Hessisch Oldendorf
Primer	Eurofins, Messel
Aqua dest.	Qiagen, Hilden

Lösungen und Puffer

Buffer J	Promega, Mannheim
Lysispuffer: 1M NaCl (29,3g), 6mM Tris (363mg), 100mM EDTA(18,61g), 0,5% Brij58 (2,5g), 0,5% Laurylsarkosin (2,5g), 0,2% Desoxycholat (1g), Aqua bidest (ad 500ml)	Merck, Darmstadt und Sigma, München
1xTE- Puffer (für Pfg): 1,211g/l 10mM Tris-HCl, 5,845g/l 1mM EDTA	Promega, Mannheim
TBE-Puffer (10x): 121,1g Tris Base, 61,8g Borsäure 1M, 5,845g 1mM EDTA	Merck, Darmstadt
10xDreamTaqBuffer	Fermentas, St. Leon- Rot
Phenylmethylsulfonylfluorid (100mM)	Merck, Darmstadt

Nährmedien und Zusätze:

Blutagar	Oxoid, Wesel
Äskulin	Merck, Darmstadt
Schafblut, Rinderblut	Fiebig, Rheinstetten
Columbia-Agar (Basis)	Merck, Darmstadt
Rinderserum	Fiebig, Rheinstetten
Standard-I-Nährbouillon	Merck, Darmstadt
Gassner-Agar	Oxoid, Wesel und Merck, Darmstadt

Marker

puc19/pBr328	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Pfge-Marker	Sigma, München
Probenauftragspuffer:	
-Bromphenolblau (0,25%) 0,083g	Merck, Darmstadt
- Xylenxyanol (0,25%) 0,083g	Merck, Darmstadt
- Glycerin (30%) 10ml	Merck, Darmstadt
- Aqua dest 23,3ml	Merck, Darmstadt

Geräte und Sonstiges

SCC-Zählgerät Fossomatic	Foss Electric, Hillerød, Dänemark
Vitek2 compact inkl. Densicheck	Biomérieux, Nürtingen
Brutschränke	Memmert, Schwabach
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Probenröhrchen mit Schraubverschluss	Biozym, Hessisch Oldendorf
Vortexer	VWR International, Darmstadt
Zentrifugen:	
- Galaxy Ministar	VWR International, Darmstadt
- Centrifuge 5417C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
TB1 Thermoblock	Biometra, Göttingen
Tiefkühlschrank (-25°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Ikamag®RCT (Magnetrührer)	Ika Labortechnik, Staufen
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Waage Explorer	Ohaus, Kirchheim
Gelschlitten Blue Marine200 Serva	Serva, Hamburg
Gelelektrophorese PowerPac	Bio-Rad, München
UV-Lampe (GelDoc 1000)	Bio-Rad, München
Gel-Video-Dokumentationssystem „Image Master“	Pharmacia Biotech jetzt GE Healthcare Life Science, Freiburg
Sicherheitswerkbank HERA safe	Heraeus, Hanau
Falcon Plastikröhrchen	Greiner, Fracht
Spiralplater	Autoplate 4000, Spiral Biotech, Inc.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich unterstützt haben.

Den Herren Prof. Dr. Axel Sobiraj und Dr. Michael Zschöck (Landesbetrieb Hessisches Landeslabor) danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung während der Durchführung der Untersuchungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Dr. Bärbel Kloppert und Dr. Wilfried Wolter danke ich dafür, dass sie das Interesse und die Begeisterung für Kühe und Milch in mir geweckt haben und bei fachlichen Fragen stets zur Verfügung standen. Bärbel ein besonderes Dankeschön für die wunderbaren Fahrten, Gedankenaustausche und Anregungen.

Den Mitarbeitern der Abteilung Veterinärmedizin des Hessischen Landeslabors (insbesondere Dr. Tobias Eisenberg, Dr. Hans-Peter Hamann, Dr. Angela Hewer, Hans-Peter Jung, Walter Mihlan, Anna Mohr, Asmahan Omar, Dr. Karen Schlez, Helga Seeger, Silke Zimmermann) danke ich herzlich für die Anleitungen und Hilfestellungen bei der Einarbeitung in die Methoden, für die Beantwortung zahlreicher Fragen und die immer sehr herzliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Christoph Lämmle (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, FB Veterinärmedizin der JLU Gießen) danke ich dafür, dass ich die Pflanze-Untersuchungen in seinem Labor mit der Unterstützung seiner Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter in einer freundlichen Arbeitsatmosphäre durchführen konnte.

Bei Dr. Alexandra Fetsch und Dr. Britta Kraushaar (NRL für koagulase-positive Staphylokokken einschließlich *S. aureus* am BfR) bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung bei der Auswertung der *spa*-Sequenzen und die durchgeführte BURP-Analyse.

Dem Familienbetrieb in Hessen danke ich für die Bereitstellung der Milchkühe, die Unterstützung bei der Entnahme der Viertelgemelksproben, die Konsequenz bei der Umsetzung der beschlossenen Maßnahmen und für die vielen freundlichen Stunden auf dem Betrieb.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die ich viele Ziele nicht so leicht erreicht hätte.

Außerdem danke ich ganz besonders Peter und Marie, Gele und Catharina, Martin und Silvia, Silke und Marc für die vielen schönen gemeinsamen Momente, die mich von der Arbeit abgelenkt haben, die mich aber auch immer wieder ermutigt und unterstützt haben.